

**MESSUNG BIOLOGISCHER GASE UND
FLÜSSIGKEITEN MIT HILFE DER
QUANTITATIVEN FLUORESCENZFOTOMETRIE
MIT INDIKATOREN**

INAUGURAL—DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Physik
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

Vorgelegt von
NORBERT OPITZ
aus Kirchende/Herdecke

Marburg/Lahn 1976

MESSUNG BIOLOGISCHER GASE UND FLÜSSIGKEITEN MIT HILFE DER QUANTITATIVEN FLUORESCENZFOTOMETRIE MIT INDIKATOREN

INAUGURAL—DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Physik
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

Vorgelegt von
NORBERT OPITZ
aus Kirchende/Herdecke

Marburg/Lahn 1976

Vom Fachbereich Physik der
Philipps-Universität Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am : 8.10.1976

Tag der mündlichen Prüfung am : 12.11.1976

Berichterstatter : Prof.Dr.H.Wolter

Mitberichterstatter : Prof.Dr.D.W.Lübbbers



I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	<u>Seite</u>
<u>Einleitung</u> : Physikalische und physiologische Problemstellung	5
1. <u>Kapitel</u> : Beschreibung der verwendeten Meßapparatur	8 - 33
1.1 Gesamtplan	8
1.2 Physikalische Grundlagen der Fluoreszenzfotometrie mit Indikatoren	10
1.3 Messung von Anregungs- und Emissionsspektren	13
1.4 Korrekturprinzip des korrigiert messenden Spektrofluorometers (KSPF)	15
1.5 Optische und elektronische Elemente des KSPF	17
1.5.1 Der Lichtleiter	17
1.5.2 Der Quantenzähler	18
1.5.3 Die Quantenblende	21
1.5.4 Der Funktionengenerator	26
1.5.5 Verstärker- und Auswertestufe	29
2. <u>Kapitel</u> : Untersuchungen über systematische und statistische Fehler des KSPF	34 - 51
2.1 Systematische Fehler	34
2.2 Statistische Fehler	40
2.2.1 Das Dunkelstromrauschen	40
2.2.2 Widerstands- und Verstärker- rauschen	45
2.2.3 Das Funkelrauschen	45
2.2.4 Das Signalrauschen	46
2.3 Messung der Empfindlichkeit	47

<u>3.Kapitel</u> : Theoretische Betrachtungen und experimentelle Befunde verschiedener Autoren zur Empfindlichkeit anderer lichtdetektierbarer Methoden.	52 - 63
3.1 Die phasenempfindliche Messung	53
3.2 Die Rauschmessung	54
3.3 Die Einzelphotonenzählung	56
3.4 Vergleich der theoretischen Signal- Rauschverhältnisse mit experimentellen Daten aus der Literatur.	59
 <u>4.Kapitel</u> : Methodische Entwicklung der Fluoreszenz- fotometrie mit Indikatoren	 64 - 85
4.1 Messungen mit B-Methylumbelliferon	65
4.1.1 Bestimmung des konzentrations- unabhängigen Bereichs der Anregungsspektren	66
4.1.2 pH-Wertabhängigkeit und Eichkurve der Anregungsspektren	70
4.1.3 Komponentenanalyse der Anregungsspektren	74
4.1.4 Das Emissionsspektrum	77
4.2 Messungen mit Pyrenbuttersäure	79
4.2.1 Das Anregungs- und Emissionsspektrum	80
4.2.2 Untersuchungen über die Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln	82

5. Kapitel : Anwendung der quantitativen Fluoreszenz- 86 - 134

fotometrie mit Indikatoren zur Messung
elektroneutraler biologischer Gase und
Flüssigkeiten.

5.1 Die Optode	89
5.1.1 Konstruktion der Meßsonde	89
5.1.2 Anforderungen an die verwendeten Membranen	89
5.1.3 Die Einstellzeit der Optode	94
5.1.4 Säubern, Füllen, Dichten und Zusammenbau der Optode	97
5.2 Die $p\text{CO}_2$ -Optode	98
5.2.1 Funktionsprinzip der $p\text{CO}_2$ -Optode	99
5.2.2 Eichkurve der $p\text{CO}_2$ -Optode und weitere Meßergebnisse	103
5.3 Die $p\text{O}_2$ -Optode	106
5.3.1 Funktionsprinzip der $p\text{O}_2$ -Optode	106
5.3.2 Eichkurve der $p\text{O}_2$ -Optode und weitere Meßresultate	109
5.3.3 Theorie der Fluoreszenzlöschung	111
5.4 Die kombinierte $p\text{O}_2$ - $p\text{CO}_2$ -Optode zur simultanen Messung des $p\text{O}_2$ und $p\text{CO}_2$	113
5.4.1 Voruntersuchungen zur simultanen $p\text{O}_2$ - $p\text{CO}_2$ -Messung	113
5.4.2 Auswerteverfahren der Summen- spektren in Anregung	117
5.4.3 Auswertung der Summenspektren in Emission	121
5.4.4 Eichkurven der kombinierten $p\text{O}_2$ - $p\text{CO}_2$ -Optode und weitere Meßergebnisse	125
5.5 Erste biomedizinische Anwendung der Optode zur Messung des oberflächlichen $p\text{O}_2$ am schlagenden Meerschweinchen- herzen in situ.	129

6. <u>Kapitel</u> : Mikro- bzw. nanoverkapselte Fluoreszenz-	135 - 151
indikatormoleküle als Meßsonden auf der	
Basis des Optoden-Meßprinzips in bis zu	
submikroskopische Größenbereiche.	
6.1 Verfahren zur Verkapselung von	136
Fluoreszenzindikatoren	
6.1.1 Die Mikroverkapselung	136
6.1.2 Die Nanoverkapselung	138
6.2 Quantitative fluorometrische Analyse	141
der H^+ -Ionenkonzentration mit Hilfe des	
nanoverkapselten pH-Indikators	
β -Methylumbelliferon.	
6.2.1 Methoden zur Überprüfung der	143
CO_2 -Undurchlässigkeit der unter-	
suchten Nanokapseln.	
6.2.2 Eichkurve der fluorometrischen	148
pH-Messung mit nanoverkapseltem	
β -Methylumbelliferon und	
weitere Meßergebnisse.	
DISKUSSION	152
ZUSAMMENFASSUNG	160
LITERATURVERZEICHNIS	163
DANKSAGUNG	173
LEBENS LAUF	174

EINLEITUNG

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Ziel begonnen, spektrofluorometrische Methoden zur quantitativen Messung biologischer Vorgänge in vitro und in vivo zu entwickeln. Neben der Untersuchung isolierter Einzelreaktionen ist man in der Physiologie, besonders aber in der Systemphysiologie, interessiert, die konzertierten Funktionen des Gesamtmechanismus, z.B. lebender Organe, zu studieren, da die einzelnen Funktionen einander gegenseitig beeinflussen. Derartige Untersuchungen an komplexen Systemen stellen zwangsläufig hohe Anforderungen an die physikalischen Untersuchungsmethoden. Die spektrometrischen Methoden der Physik werden diesen Ansprüchen weitestgehend gerecht, da sie sich durch den relativ geringen Eingriff der Messung in den biologischen Vorgang auszeichnen. Darüberhinaus sind Geräte wie z.B. das Rapidspektrofotometer nach LÜBBERS und NIESEL^(62,63,77,78) wegen ihrer Schnelligkeit (100 Spektren pro Sekunde) geeignet, auch an lebenden Organen zu messen, da bei dieser Registriergeschwindigkeit die Eigenbewegungen des Organs vernachlässigt werden können.

Bei den spektrometrischen Methoden unterscheidet man die Spektrofluorometrie von der Absorptions- bzw. Reflexionspektrometrie. Die Vorteile der Fluorometrie sind ihre höhere Empfindlichkeit und größere Spezifität, da sich zwei Spektren zur Identifizierung einer Substanz anbieten, nämlich das Anregungs- und Emissionsspektrum.

Für die Untersuchungen stand das korrigiert messende Spektrofluorometer nach BOLDT und LÜBBERS⁽¹²⁾ zur Verfügung, das die aufgezeichneten Spektren gegen sämtliche Apparatecharakteristika korrigiert.

Allen spektrometrischen Methoden gemeinsam ist die Schwierigkeit der Auswertung von Gewebespektren gegenüber Küvettenspektren, da die Gewebespektren häufig verzerrt sind⁽⁶¹⁾. Die Verzerrungen werden bei der Reflexionsfotometrie z.B. durch inhomogene Farbstoffverteilungen^(110,111,114) und wellenlängenabhängige Lichtwege^(113,115) im Gewebe verursacht. Verzerrungen der Spektren biochemischer Fluorochrome können durch selektive Absorption im Gewebe und durch Wechselwirkungen mit anderen Stoffen bedingt sein.

Mit der Queranalyse bzw. der erweiterten Queranalyse nach WODICK und LÜBBERS^(67,68,112) existiert ein Auswerteverfahren, das trotz der Verzerrungen der Spektren eine Quantifizierung biochemischer Vorgänge ermöglicht. Dieses Verfahren ist unglücklicherweise relativ kompliziert und benötigt die Registrierung des gesamten Spektrums oder mindestens Messungen an zahlreichen Wellenlängen.

Mit Fluoreszenzindikatoren, die in Abhängigkeit von der Konzentration anderer Stoffe entweder die Intensität oder aber die spektrale Verteilung ihres Fluoreszenzspektrums ändern, bieten sich empfindliche Sensoren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung dieser Stoffe an, wenn es gelingt, die störenden Effekte des Gewebes zu eliminieren.

Dazu kommt, daß der Indikator keine toxischen Einwirkungen auf das zu untersuchende biologische Material haben darf.

Mit der Konstruktion einer speziellen Meßsonde, der sogenannten Optode^(64,65), gelang es, die störenden Einflüsse auszuschalten, da das zu untersuchende Medium durch eine Membran von dem Meßraum der Optode getrennt war.

Auf der Basis des Optoden-Meßprinzips konnten so wichtige physiologische Parameter wie pO_2 , pCO_2 und pH mit Hilfe der quantitativen Fluoreszenzfotometrie mit Indikatoren bestimmt werden.

1. Kapitel : Beschreibung der verwendeten Meßapparatur

1.1 Gesamtplan

Das korrigiert messende Spektrofluorometer (abgekürzt KSPP) nach BOLDT⁽¹²⁾ und LÜBBERS zur Messung an trüben Medien wurde hinsichtlich der elektronischen Auswertung und der Messung korrigierter Emissionsspektren modifiziert. Die Modifikationen⁽⁺⁾ werden in den Abschnitten 1.5.4 und 1.5.5 beschrieben. Eine schematische Darstellung des Fotometers zeigt die Abb. 1 .

Der Lichtbogen einer Xenonhochdrucklampe (XBO 150 W/1) wird mittels eines Reflektors und Kondensors mit hoher Leuchtdichte auf den Eingangsspalt des Anregungsmonochromators (Bausch & Lomb , Halbwertsbreite 3,3nm/mm) abgebildet. Der Monochromator selektiert monochromatische Strahlung bestimmter Wellenlänge aus dem Emissionsspektrum der Lampe. In der Bildebene des Monochromatorgitters (600 Striche/mm) fällt die monochromatische Strahlung auf den Eingang eines Lichtleiters, dessen Ende eine Vergabelung in Meß- und Referenzzweig aufweist.

Dem Meßzweig folgend wird der Ausgang des Lichtleiters mit einem Konkavspiegel auf die Meßküvette abgebildet, in der sich die zu untersuchende Fluoreszenzlösung befindet, welche infolge der Absorption der Anregungsstrahlung fluoresziert. Ein Teil der emittierten Fluoreszenzquanten, der bei einem homogenen Anregungslichtbündel für alle Anregungswellenlängen

(+) Modifikationen von M. Boldt und G. Weidemann

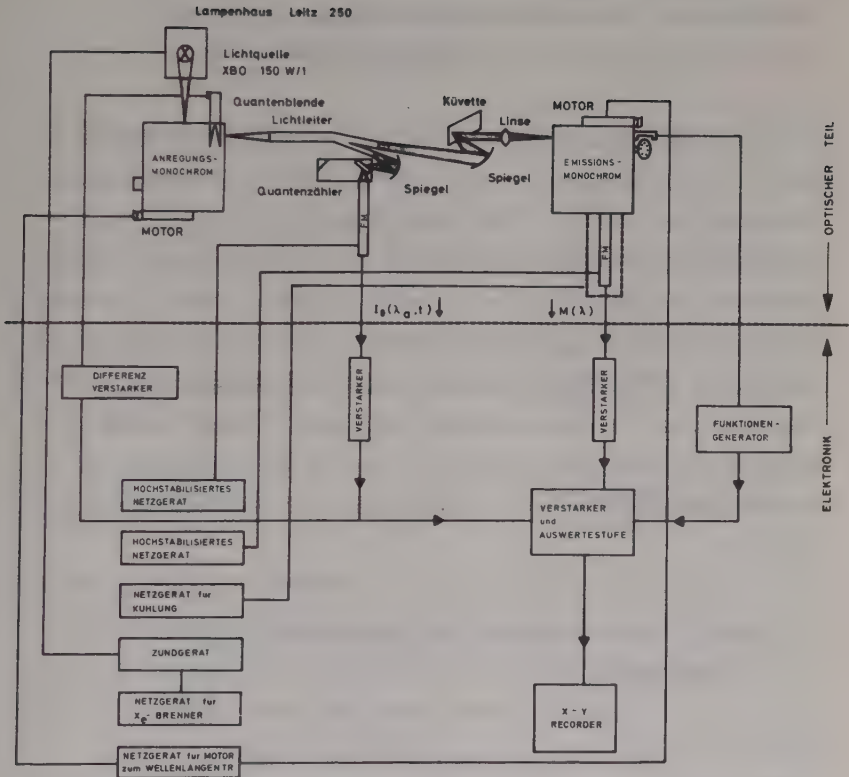


Abb.1 : Schematische Darstellung des modifizierten, korrigiert messenden Spektrofluorometers nach BOLDT und LÜBBERS .

gleich groß ist, gelangt in den Emissionsmonochromator. Am Ausgang des Emissionsmonochromators setzt ein in der Bildebene des Gitters befindlicher Fotomultiplier die einfallende Strahlung in Stromsignale um.

Der Referenzzweig, in dem die gleichen optischen Bedingungen herrschen wie im Meßzweig, dient zur Kontrolle der Anregungsstrahlung. Die Kontrolle wird dadurch erreicht, daß ein mit dem Anregungslicht spektralgleicher Strahl auf einen Kontrollempfänger geleitet wird, dessen Empfindlichkeit nahezu unabhängig von der Wellenlänge ist. Das elektrische Signal des Kontrollempfängers $I_o(\lambda_a, t)$ wird zugleich zur elektronischen Korrektur des Fluoreszenzsignals $M(\lambda)$ und in einer Gegenkopplungsregelung zur Kompensation der Schwankungen des aus dem Anregungsmonochromators heraustretenden Anregungslichtes verwendet.

1.2 Physicalische Grundlagen der Fluoreszenzfotometrie mit Indikatoren

Betrachtet werde ein homogener, isotroper Körper, z.B. eine Küvette, gefüllt mit einer fluoreszierenden Indikatorlösung. Monochromatisches Licht falle senkrecht zu einer der Flächen ein. Das erregende Licht habe die Wellenlänge λ_a und entspreche an der Oberfläche der Küvette einer Intensität $I_o(\lambda_a)$. In einer Tiefe x der Küvette ist die Intensität auf den Wert $I_x(\lambda_a)$ vermindert, der sich, von Reflexionsverlusten abgesehen, nach dem LAMBERT-BEER'schen Absorptionsgesetz⁽⁵⁵⁾ folgendermaßen ergibt :

$$I_x(\lambda_a) = I_0(\lambda_a) \cdot e^{-\epsilon(\lambda_a) \cdot c \cdot x} \quad (1.2-1)$$

Mit : c = Konzentration ; x = Schichtdicke ;
 ϵ = molarer Extinktionskoeffizient

Die Änderung der Intensität mit der Schichtdicke ergibt sich zu :

$$dI_x(\lambda_a) = I_0(\lambda_a) \cdot e^{-\epsilon(\lambda_a) \cdot c \cdot x} \cdot (-\epsilon(\lambda_a) \cdot c) \cdot dx \quad (1.2-2)$$

Die Integration über die gesamte Schichtdicke d der Küvette liefert den absorbierten Anteil $I_{abs}(\lambda_a)$ der einfallenden Lichtintensität $I_0(\lambda_a)$:

$$I_{abs}(\lambda_a) = \int_0^d dI_x(\lambda_a) = I_0(\lambda_a) \cdot \left[1 - e^{-\epsilon(\lambda_a) \cdot c \cdot d} \right] \quad (1.2-3)$$

Diesem Teil der absorbierten Lichtintensität ist die in der gleichen Schicht entstehende Fluoreszenzintensität $I_{Fl}(\lambda_a, \lambda_e)$ proportional, die sich auf den Wellenlängenbereich des Fluoreszenzspektrums verteilt :

$$I_{Fl}(\lambda_a, \lambda_e) = I_{abs}(\lambda_a) \cdot \eta(\lambda_a, \lambda_e) \quad (1.2-4)$$

$\eta(\lambda_a, \lambda_e)$ bezeichnet man als die Fluoreszenz- bzw. Quantenausbeute ⁽³¹⁾ des Indikators. In Gleichung (1.2-4) wurden weder die Absorption des Fluoreszenzlichtes in der Küvette auf dem Weg zur Oberfläche, noch die durch Absorption des primären Fluoreszenzlichtes gegebenenfalls entstehende

Sekundärfluoreszenz berücksichtigt. Dieses Vorgehen ist bei geringer Schichtdicke und niedriger Konzentration der Indikatorlösung erlaubt. Bei Fluoreszenzindikatoren ist nun die Quantenausbeute Funktion weiterer unabhängiger Variabler, wie z.B. pO_2 , pH und somit auch pCO_2 .

Die funktionelle Abhängigkeit der Quantenausbeute bietet daher die Möglichkeit, diese Größen fluorometrisch zu bestimmen.

In Anlehnung an die physikalische Farbenlehre nach WOLTER^(117,118,120) kann der Einfluß des Fluoreszenzindikators auf Licht bzw. UV-Strahlung auch durch einen Operator F beschrieben werden, der die Eigenschaft hat, die Spektralfunktion $I_{abs}(\lambda_a)$ in die Spektralfunktion $I_{Fl}(\lambda_a, \lambda_e)$ zu transformieren⁽⁴⁸⁾:

$$I_{Fl}(\lambda_a, \lambda_e) = F \cdot I_{abs}(\lambda_a) \quad (1.2-5)$$

Setzt man voraus, daß der Operator F linear ist und die Spektralfunktionen nach einem vollständigen Orthogonalsystem entwickelbar sind, dann kann er sowohl durch einen Integralkern $F(\lambda_a, \lambda_e)$ als auch durch eine Matrix $F_{l,k}$ dargestellt werden:

$$I_{Fl}(\lambda_a, \lambda_e) = \int F(\lambda_a, \lambda_e) \cdot I_{abs}(\lambda_a) \cdot d\lambda_a \quad (1.2-6)$$

bzw.

$$I_{Fl,l} = \sum_{k=0}^{\infty} F_{l,k} \cdot I_{abs,k} \quad (1.2-7)$$

Die experimentelle Bestimmung des Operators mit Hilfe des Integralkerns verlangt eine relativ einfache Meßvorschrift. Aus Gl.(1.2-6) folgt bei Anwendung auf eine δ -Funktion :

$$\int F(\lambda_a, \lambda_e) \cdot \delta(\lambda_a - \lambda_a') \cdot d\lambda_a = F(\lambda_a', \lambda_e) \quad (1.2-8)$$

$F(\lambda_a', \lambda_e)$ ist dabei als die spektrale Verteilung zu verstehen, die vom Indikator emittiert wird, wenn dieser mit monochromatischem Licht der Wellenlänge λ_a' bestrahlt wird.

Statt des Operators F bzw. der Quantenausbeute η registrieren wir mit dem KSPF den Quotienten :

$$\frac{I_{Fl}(\lambda_a, \lambda_e)}{I_0(\lambda_a)} = \eta(\lambda_a, \lambda_e) \cdot \left[1 - e^{-\epsilon(\lambda_a) \cdot c \cdot d} \right], \quad (1.2-9)$$

der über die Gl.(1.2-3) und (1.2-4) mit der Quantenausbeute verknüpft ist.

Dabei ergeben sich meßtechnisch zwei Möglichkeiten der Registrierung, das Anregungs- und das Emissionsspektrum.

1.3 Messung von Anregungs- und Emissionsspektren

„Als Anregungsspektrum $Fl(\lambda_a, \lambda_e)$ bezeichnet man das Verhältnis der Anzahl der emittierten Quanten $I_{Fl}(\lambda_a, \lambda_e)$ zur Anzahl der auf die Probe gesandten $I_0(\lambda_a)$ bei verschiedenen Anregungswellenlängen λ_a und bei unveränderter Emissionswellenlänge λ_e :

$$Fl(\lambda_a, \lambda_e) = \frac{I_{Fl}(\lambda_a, \lambda_e)}{I_0(\lambda_a)} \quad \text{mit } \lambda_e = \text{konst.} \quad (1.3-1)$$

Zur Messung wird der Emissionsmonochromator auf die Wellenlänge der maximalen Fluoreszenz eingestellt, während die Anregungswellenlänge mittels des ersten Monochromators variiert wird. Das Signal $M(\lambda_a)$, das bei dieser Messung zum Fotomultiplier gelangt, setzt sich aus dem Anregungsspektrum und aus mehreren multiplikativen Gewichtsfunktionen zusammen :

$$M(\lambda_a) = L(\lambda_a, t) \cdot O_1(\lambda_a, t) \cdot Fl(\lambda_a, \lambda_e) \cdot O_2(\lambda_e, t) \cdot FM(\lambda_e, t) \cdot K_1$$

$$\text{mit } \lambda_e = \text{konst.} \quad (1.3-2)$$

Dabei sind :

$L(\lambda_a, t)$ die Emissionscharakteristik der Anregungslampe,
 $O_1(\lambda_a, t)$ der absolute Betrag der komplexen Übertragungsfunktion der Optik zwischen Anregungslampe und Meßküvette,
 $O_2(\lambda_e, t)$ der absolute Betrag der komplexen Übertragungsfunktion der Optik zwischen Meßküvette und Fotomultiplier,
 $FM(\lambda_e, t)$ die Empfindlichkeitscharakteristik des Fotomultipliers und K_1 eine Konstante, die den Bruchteil der gesamten emittierten Fluoreszenz angibt, der zur Auswertung in den Emissionsmonochromator gelangt. Ferner gilt für das Anregungslicht $I_0(\lambda_a, t)$:

$$I_0(\lambda_a, t) = L(\lambda_a, t) \cdot O_1(\lambda_a, t) \quad (1.3-3)$$

Als Emissionsspektrum $Fl(\lambda_a, \lambda_e)$ bezeichnet man das Verhältnis der Anzahl der emittierten Quanten $I_{Fl}(\lambda_a, \lambda_e)$ zur Anzahl der auf die Probe gesandten $I_o(\lambda_a)$ bei verschiedenen Emissionswellenlängen λ_e und bei unveränderter Anregungswellenlänge λ_a .

$$Fl(\lambda_a, \lambda_e) = \frac{I_{Fl}(\lambda_a, \lambda_e)}{I_o(\lambda_a)} \quad \text{mit } \lambda_a = \text{konst.} \quad (1.3-4)$$

Zur Messung wird der Anregungsmonochromator auf die Wellenlänge der maximalen Anregung fixiert, während der Emissionsmonochromator die Wellenlängen nacheinander durchläuft.

Das vom Fotomultiplier abgegebene Signal $M(\lambda_e)$ setzt sich zusammen aus :

$$M(\lambda_e) = L(\lambda_a, t) \cdot O_1(\lambda_a, t) \cdot Fl(\lambda_a, \lambda_e) \cdot O_2(\lambda_e, t) \cdot FM(\lambda_e, t) \cdot K_1$$

$$\text{mit } \lambda_a = \text{konst.} \quad (1.3-5)$$

Die Spektren $M(\lambda_a)$ und $M(\lambda_e)$ müssen bezüglich ihrer apparativen Gewichtsfunktionen $L(\lambda_a, t)$, $O_1(\lambda_a, t)$, $O_2(\lambda_e, t)$ und $FM(\lambda_e, t)$ korrigiert werden, um die korrigierten Anregungs- und Emissionsspektren zu erhalten." (Zit. aus M. Boldt (12))

1.4 Korrekturprinzip des KSPF

Da das korrigiert messende Spektrofluorometer zur Messung relativer Spektren konzipiert wurde, genügt es, die Spektren gegen sämtliche Apparatecharakteristika wie :

- a) Emissionscharakteristik der Anregungslampe
- b) Übertragungsfunktion der Optik
- c) Empfangscharakteristik des Fotomultipliers

zu korrigieren. Die Korrektur wird folgendermaßen realisiert :
Bei der Messung von Anregungsspektren gilt wegen $\lambda_e = \text{konst.}$:

$$M(\lambda_a) = L(\lambda_a, t) \cdot O_1(\lambda_a, t) \cdot Fl(\lambda_a) \cdot K_o$$

$$\text{mit } K_o = \text{konst.} \quad (1.4-1)$$

Damit muß das Meßsignal gegen das Anregungslicht $I_o(\lambda_a, t)$ korrigiert werden. Dies geschieht mit Hilfe einer elektronischen Dividierstufe, die kontinuierlich den Quotienten aus dem Meß- und Referenzsignal bildet und damit das korrigierte Anregungsspektrum liefert :

$$Fl(\lambda_a) \cdot K_o = \frac{M(\lambda_a)}{I_o(\lambda_a, t)} \quad (1.4-2)$$

Wegen $\lambda_a = \text{konst.}$ im Falle der Emissionsmessung folgt für das Meßsignal :

$$M(\lambda_e) = Fl(\lambda_e) \cdot K_{10} \cdot O_2(\lambda_e, t) \cdot FM(\lambda_e, t)$$

$$\text{mit } K_{10} = \text{konst.} \quad (1.4-3)$$

Die Korrektur erfolgt hier durch einen Funktionengenerator,

an dem die reziproke Fehlerfunktion :

$$V(\lambda_e, t) = \left[O_2(\lambda_e, t) \cdot FM(\lambda_e, t) \right]^{-1} \quad (1.4-4)$$

eingestellt wird, die zusammen mit dem Meßsignal $M(\lambda_e)$ in einen elektronischen Multiplizierer gegeben wird, an dessen Ausgang dann das korrigierte Emissionsspektrum anliegt :

$$Fl(\lambda_e) \cdot K_{10} = M(\lambda_e) \cdot V(\lambda_e, t) \quad (1.4-5)$$

1.5 Optische und elektronische Elemente des KSPF

1.5.1 Der Lichtleiter

Bei allen korrigiert messenden Spektrofluorometern wird ein Teil des Anregungslichtbündels auf einen Normalempfänger gesandt. Die Benutzung sowohl eines partiell durchlässigen Teilerspiegels als auch eines "choppers" erscheint deshalb nicht optimal, weil das Anregungslichtbündel spektral sehr inhomogen ist.

Die in Fotometern zur Lichthomogenisierung häufig benutzte Ulbrichtsche Kugel kann in dieser Meßanordnung wegen zu hoher Lichtverluste nicht verwendet werden. Der Anregungsstrahl muß nach seiner Homogenisierung auf die Probenküvette abgebildet werden, was infolge der starken Vergrößerung der Apertur des Strahles durch die Ulbrichtsche Kugel mit sehr großem Lichtverlust verbunden ist.

Aus diesen Gründen verwenden wir einen zweiarmigen Quarzlichtleiter, bei dem der eine Arm das Anregungslicht und der andere das Referenzlicht führt. Das gemeinsame Ende hat einen quadratischen Querschnitt und nimmt das Licht in der Bildebene des Monochromatorgitters auf. Damit ist die Ausleuchtung des Lichtleiters unabhängig von der benutzten Spaltbreite des Monochromators. Die Fasern des Referenzarmes sind so ausgesucht, daß sie im gemeinsamen Lichtleiterende gleichmäßig verteilt sind (Abb. 2). Bei 500 Fasern des Referenzarmes und 5000 Fasern des Anregungsarmes wird bei völlig gleichmäßiger Verteilung der Referenzfasern pro zwei Promille der Querschnittsfläche des Anregungsstrahles eine Probe für den Referenzstrahl entnommen.

Der so erzeugte Referenzstrahl ist nach Abb. 3 nahezu spektralgleich mit dem Anregungsstrahl.

Außerdem ist die gegenseitige Orientierung der einzelnen Fasern am Ende der zwei Lichtleiterarme nach Durchmischen der Fasern bei der Herstellung anders als am gemeinsamen Anfang, wodurch eine spektrale Homogenisierung des Anregungslichtes erzielt wird. (Zit. nach M. Boldt (12))

1.5.2 Der Quantenzähler

Die Registrierung des Referenzstrahles erfolgt durch einen Quantenzähler. Die Lösung des Stoffes Rhodamin B^(87,88) in Äthylenglykol fluoresziert bei Anregung mit Licht von 220nm bis 600nm mit nahezu konstanter Quantenausbeute⁽⁷²⁾.

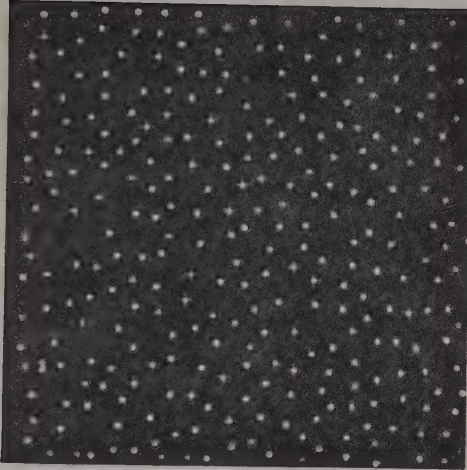


Abb.2 : Gleichmäßige Verteilung der Referenzlichtfasern über der Querschnittsfläche des mit den Meßlichtfasern gemeinsamen Lichtleiterendes. (nach M.Boldt,unveröffentlicht)

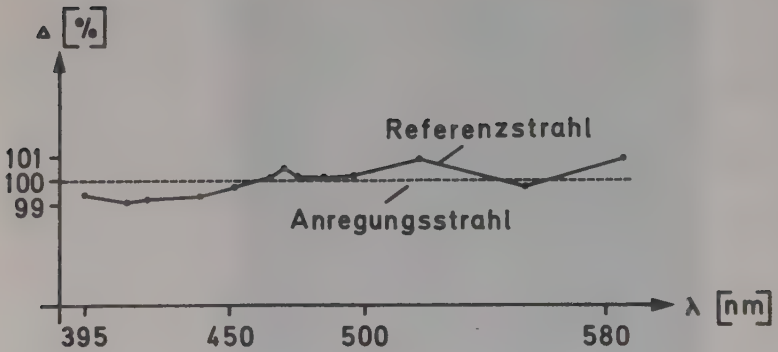


Abb.3 : Vergleich der Spektralverteilungen von Referenz- und Anregungsstrahl. Der Anregungsstrahl wurde als Bezugssignal auf 100 % gesetzt.

In der Konzentration 3g Rhodamin B pro Liter Äthylenglykol wird diese Lösung in Verbindung mit einem Fotomultiplier als Lichtempfänger mit wellenlängenunabhängiger Empfangscharakteristik verwendet^(23,87). Der Fotomultiplier registriert dabei das Fluoreszenzlicht der Lösung in einem unveränderten Wellenlängenbereich, so daß seine Charakteristik nicht auf das Signal einwirkt. Bei fester geometrischer Anordnung ist die Zahl der vom Fotomultiplier registrierten Fluoreszenzquanten bei jeder Anregungswellenlänge ein konstanter Anteil der Gesamtfluoreszenz und dieser ist wieder bei konstanter Quantenausbeute proportional zur Quantenzahl des Anregungslichtes.

Abb.4 zeigt die Quantenzähleranordnung zur Registrierung des Referenzstrahles. Das Kantenfilter RG 630 der Firma Schott schützt den Fotomultiplier vor Streulichtstrahlung. Nach BOLDT⁽¹²⁾ ist die so dargestellte Quantenzähleranordnung dem Thermoelement als Referenzempfänger in Empfindlichkeit und Ansprechzeit weit überlegen. (Zit. nach M. Boldt (12))

1.5.3 Die Quantenblende

„Die Registrierung des Anregungslichtes über einen Referenzstrahl hat den Sinn, die Einwirkung zeitlicher Änderungen des Quantenstromes der Anregung auf das Fluoreszenzsignal zu eliminieren. Das geschieht zunächst durch die elektronische Division (siehe Abschnitt 1.4), wobei das Referenzsignal den Nenner darstellt.

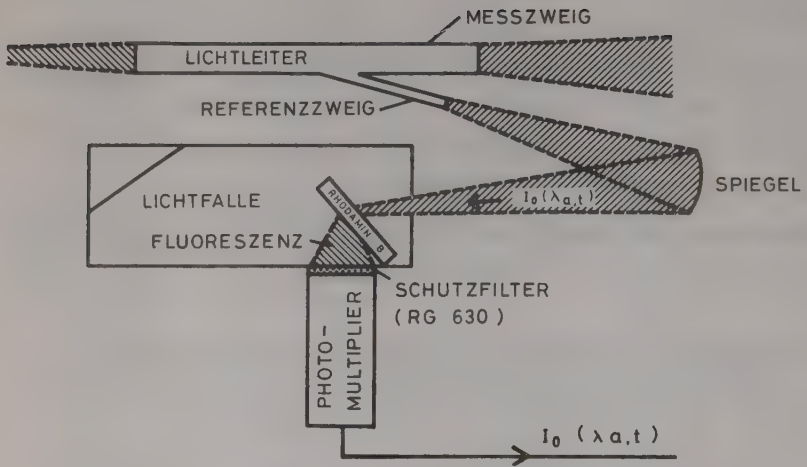


Abb.4 : Quantenzähleranordnung zur Registrierung
des Referenzstrahles (vergl. Abb.16 (12))

Nun haben elektronische Dividierer Fehler, die mit kleiner werdendem Nenner größer werden. Das Modell 426 K der Firma Analog Devices, das hier verwendet wird, ist z.B. mit einem Fehler von maximal 100 mV im Bereich von -1V bis -10V für den Nenner angegeben. Bei Werten des Nenners zwischen -0,2V bis -1V ist das Ergebnis mit maximal 500 mV behaftet. Bei Vorgabe eines engen Variationsbereiches des Nenners kann die Genauigkeit des Dividierers in einem engen Bereich durch Trimmer erhöht werden. Demzufolge ermöglicht eine Verringerung der Variation des Anregungsquantenflusses und damit des Nenners eine Erhöhung der Genauigkeit der elektronischen Division.

Bei der hier verwirklichten Anordnung wird das Quantenzähler-signal mit einer variabel einstellbaren Spannung verglichen. Die Differenzspannung steuert über einen Drehmagneten eine V-Blende derart, daß bei erhöhtem Quantenfluß die effektive Spalthöhe, nicht die Spaltbreite, des Ausgangsspalt des Anregungsmonochromators verkleinert wird (Abb.5) .

Die Bandbreite des Anregungssignals bleibt folglich unverändert. Durch die Vorgabe einer festen Vergleichsspannung wird die Nullage des V-Spalt und somit die Größe des Quantenflusses festgelegt, bei dem die Rückregelung erfolgt.

Die Wirkung der Quantenblende und der Nullagenregelung ist in Abb.6 aufgezeigt. Kurve 1 stellt den Quantenfluß als Funktion der Wellenlänge ohne Einwirkung der Quantenblende dar. Die Kurven 2 und 3 sind mit eingeschalteter Quantenblende

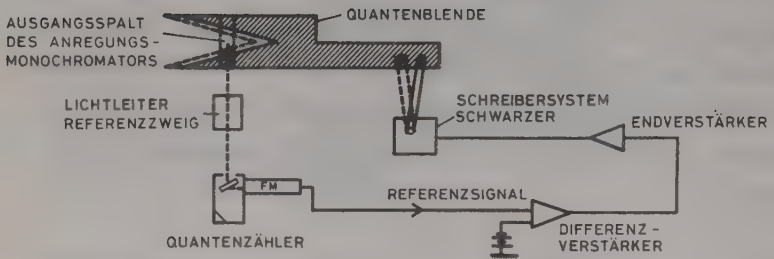


Abb.5 : Schematische Darstellung der
Quantenblende und des Regelkreises
(vergl. Abb.20 (12))

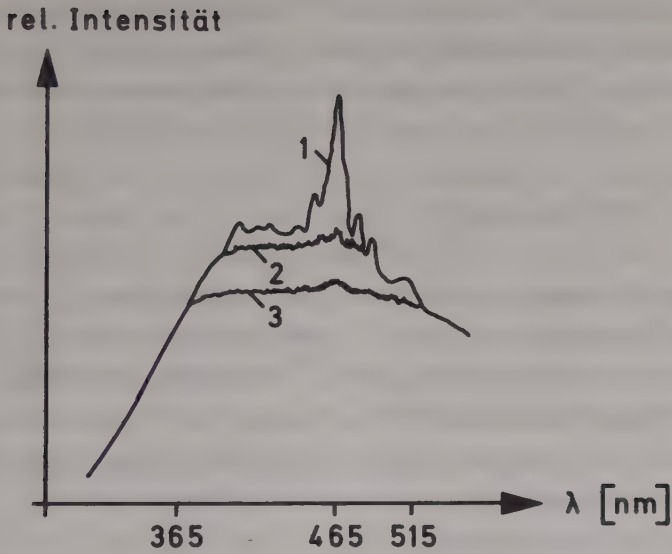


Abb.6 : Regelung des Quantenflusses der Anregungsstrahlung durch die Quantenblende, bei zwei verschiedenen Einstellungen der Nullage (2,3).

bei zwei verschiedenen Einstellungen der Nullage geschrieben worden. Die Regelgenauigkeit hängt im Wesentlichen vom mechanischen Aufbau der Anordnung ab, insbesondere von einer weitgehend reibungslosen Führung der Quantenblende innerhalb des Monochromators. Sprunghafte Änderungen im Spektralverlauf werden wegen der Trägheit der elektronischen Anordnung nur unvollkommen ausgeregelt." (Zit. aus M. Boldt (12))

1.5.4 Der Funktionengenerator

Wie schon im Abschnitt 1.4 dargelegt wurde, müssen die Emissionsspektren gegen sämtliche Apparatecharakteristika korrigiert werden. Auf das von BOLDT⁽¹²⁾ beschriebene Verfahren, mit Hilfe eines Vergleichsspektrums $W(\lambda)$ einer Wolframbandlampe diese Korrektur durchzuführen, wurde verzichtet, da diese Methode hinsichtlich der apparativen Anforderungen und der Auswertung zu aufwendig war.

Verwendet wurde deshalb ein von BOLDT, WEIDEMANN und PIONTEK konstruierter Funktionengenerator, an dem an 64 Potentiometern eine variable Korrekturfunktion $V(\lambda_e, t)$ eingestellt wird, die, synchronisiert auf den Wellenlängenbereich der Emissionsspektren, gleichzeitig mit dem Meßsignal in den Multiplizierer der Auswertestufe geführt werden kann.

Die Synchronisation erfolgt dabei mit Hilfe einer Fotozelle und einer kreisförmigen Scheibe, auf deren Peripherie eine Vielzahl von Lochblenden in regelmäßigen Abständen angeordnet ist. Die mit dem Wellenlängentransport des Emissionsmono-

chromators fest verkoppelte Scheibe dreht sich zwischen der Fotozelle und einem Lämpchen, wobei alle 3nm die Fotozelle einen Impuls abgibt, wenn Licht durch eine Blende auf die Zelle fällt. Nacheinander werden so durch die Spannungsimpulse die 64 Potentiometer des Funktionengenerators angesteuert und die verschiedenen Spannungswerte abgerufen.

Von Bedeutung bei diesem Korrekturverfahren ist die Stabilität der eingestellten Spannungswerte der Potentiometer. Die durch die Temperatur verursachte Spannungsdrift beträgt jedoch nach halbstündiger Aufheizzeit nur wenige Promille (Abb.7). Die Korrekturfunktion für die Emissionsspektren wurde folgendermaßen ermittelt. Anstelle der Meßküvette im Meßzweig wurde eine mit MgO_2 bedampfte, plane Metallplatte angebracht, die das Anregungslicht spektral unverfälscht, diffus in den Emissionsmonochromator streut. Der Wellenlängenbereich von 400 - 592 nm wurde dann in 64 äquidistanten Schritten durchlaufen, wobei der Anregungsmonochromator jeweils auf die selbe Wellenlänge eingestellt wurde.

Wegen $\lambda_a = \lambda_e$ gilt dann für das Meßsignal $M(\lambda)$:

$$M(\lambda) = L(\lambda, t) \cdot O_1(\lambda, t) \cdot FM(\lambda, t) \cdot K_1 \cdot O_2(\lambda, t) \quad (1.5.4-1)$$

und für das Referenzsignal $R(\lambda)$:

$$R(\lambda) = L(\lambda, t) \cdot O_1(\lambda, t) \cdot K_{11} \quad (1.5.4-2)$$

Multipliziert man den Quotienten aus M und R mit der

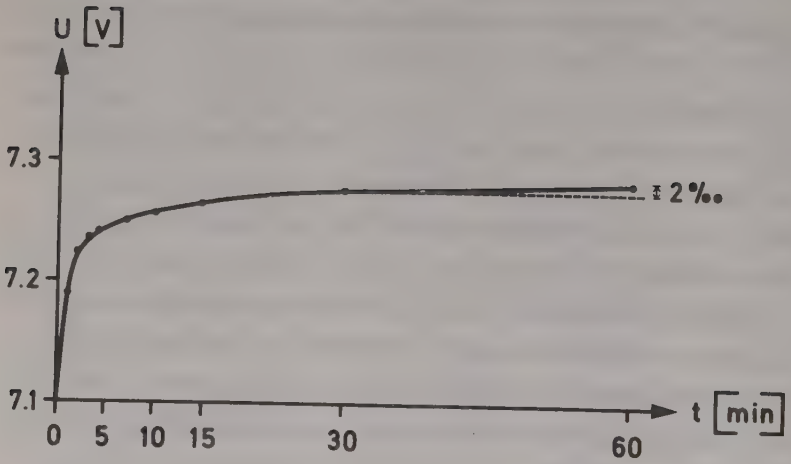


Abb.7 : Temperaturbedingte Spannungsdrift eines
Potentiometers des Funktionengenerators

geeigneten Korrekturfunktion $V(\lambda_e)$ des Funktionengenerators bei sämtlichen 64 Wellenlängeneinstellungen, so muß gelten :

$$O_2(\lambda, t) \cdot FM(\lambda, t) \cdot V(\lambda_e, t) = \text{konst.} \quad (1.5.4-3)$$

Der Vorgang ist also der, mit Hilfe der Potentiometer des Funktionengenerators für jede Wellenlänge das Ausgangssignal des Multiplizierers auf einen konstanten Wert abzugleichen. Eine so ermittelte Korrekturfunktion zeigt Abb.8 .

Eine weitere Möglichkeit, die Korrekturfunktion zu bestimmen, besteht in dem Vergleich von unkorrigierten mit bekannten, korrigierten Emissionsspektren. Die Transformationsfunktion ist dann gleich der Korrekturfunktion.

1.5.5 Verstärker- und Auswertestufe

Die beschriebenen Lichtsignale im Meß- und Referenzzweig werden von den Fotomultipliern in Stromsignale umgewandelt. Diese Stromsignale müssen verstärkt und ausgewertet werden. Die Erfassung und die Verarbeitung der Signale sollen hier diskutiert werden.

Die Fotomultipliersignale werden in Strom-Spannungswandlern bis auf maximal 50 mV verstärkt und anschließend in die Verstärker- und Auswertestufe (Abb.9) gegeben.

Auf der 1. bzw. 3. Platine wird eine Impedanzwandlung mit nachfolgender Verstärkung vorgenommen bevor das Signal auf die 2. bzw. 4. Platine geführt wird, auf der nochmals eine

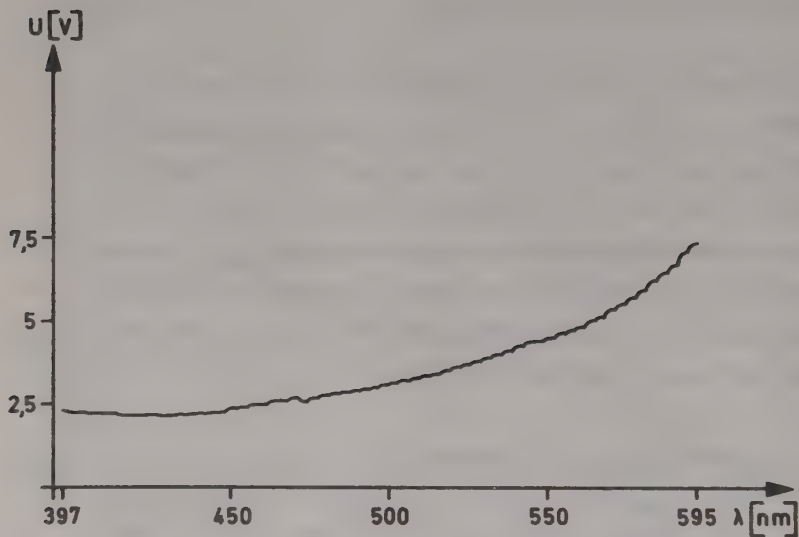


Abb.8 : Korrekturfunktion $V(\lambda_e, t)$ des Funktions-
generators im Wellenlängenbereich von
400 - 600 nm .

variable Verstärkung ausgelegt ist und ferner eine Nullstromkorrektur des Fotomultiplierdunkelstromes ausgeführt werden kann. Die Konzeption der elektronischen Schaltung ist bis zu diesem Punkt für Meß- und Referenzsignal identisch.

Im Falle der Anregungsmessung findet auf der 5. Platine mittels eines elektronischen Dividierers (Analog Devices, 426 K) die kontinuierliche Division von Meß- und Referenzsignal statt. Dabei wird folgende Operation ausgeführt :

$$\frac{M(\lambda_a, t)}{I_o(\lambda_a, t)} \cdot 10 = Fl(\lambda_a) \cdot K_o \quad (1.5.5-1)$$

Um eine Nennergenauigkeit von 5% zu erhalten, muß der Dividierer wie folgt limitiert werden :

$$\begin{aligned} -10 \text{ V} &\leq M(\lambda_a, t) \leq +10 \text{ V} \\ -10 \text{ V} &\leq I_o(\lambda_a, t) \leq -0,2 \text{ V} \end{aligned} \quad \text{und} \quad \left| I_o(\lambda_a, t) \right| \geq M(\lambda_a, t)$$

Um die Bedingungen zu erfüllen, wurden hinter die 3. bzw. 4. Platine Zenerdioden geschaltet, die die Signale auf maximal -9,5 V begrenzen.

Der Quotient aus Meß- und Referenzsignal, also das korrigierte Anregungsspektrum $Fl(\lambda_a) \cdot K_o$, liegt dann am Ausgang der Auswertestufe an und wird auf die vertikale Achse eines X-Y-Schreibers gegeben.

Bei Emissionsmessungen wird der Quotient auf die 6. Platine geleitet und mit Hilfe des Multiplizierers mit der Korrekturfunktion $V(\lambda_e, t)$ multipliziert.

$$\frac{M(\lambda_e, t)}{I_0(\lambda_a, t)} \cdot 10 \cdot V(\lambda_e, t) = F1(\lambda_e) \cdot K_{10} \quad (1.5.5-2)$$

Auch dieses Signal, das korrigierte Emissionsspektrum, wird anschließend auf die vertikale Ablenkung des X-Y-Schreibers geführt.

Die Wellenlängenregistrierung wird durch ein 3-Wendel-Potentiometer, dessen Achse starr mit der Wellenlängentrommel verbunden ist, realisiert. Die am Potentiometer abgegriffene Spannung, deren Wert in Wellenlängen geeicht ist, steuert die horizontale Ablenkung des Zweikanalschreibers. Die Wellenlängeneinstellung ist mit einem Fehler von maximal $\pm 0,5 \text{ nm}$ behaftet.

2. Kapitel : Untersuchungen über systematische und statistische Fehler des KSPF

Das Ziel dieser Arbeit, die Quantifizierung der Fluoreszenz-fotometrie mit Indikatoren, machte es erforderlich, detaillierte Angaben über die Genauigkeit und die Empfindlichkeit des KSPF aufzustellen. Zu diesem Zweck wurden Untersuchungen über systematische und statistische Fehler des Gerätes durchgeführt.

2.1 Systematische Fehler

Aus dem Korrekturprinzip (Kapitel 1.4) des KSPF folgt, daß die Spektren der Anregungsstrahlung im Meß- und Referenzzweig genau übereinstimmen müssen, da das Fluoreszenzanregungsspektrum gegen das Anregungslicht korrigiert wird (Gl. (1.3-3) und (1.4-2)). Zur Überprüfung dieser Forderung wurden die Spektren mit einem linear messenden Fotodetektor, Typ Pin 10 der Firma United Detector Technology, einmal am Ort der Meßküvette im Meßzweig, das andere Mal an der Stelle der Quantenzähleranordnung im Referenzzweig aufgenommen.

Die Messungen ergaben, daß die Abweichungen der spektralen Verteilung des Referenzstrahles vom Meßstrahl innerhalb $\pm 1\%$ lagen (siehe Abb. 3, Kapitel 1.5.1).

Die gute Übereinstimmung der Spektren bestätigt damit das Verfahren der Referenzlichterzeugung mit Hilfe des schon beschriebenen Lichtleiters.

Ein weiteres Kriterium für hohe Meßgenauigkeit ist die Forderung nach wellenlängenunabhängiger Empfangscharakteristik des Quantenzählers.

Messungen von BOLDT⁽¹²⁾ zeigen (Abb.10), daß die Schwankungsbreite dieser Quantenzähleranordnung etwa 7% im Spektralbereich von 300 - 600 nm beträgt, bezogen auf Kontrollmessungen, die mit einem Thermoelement durchgeführt wurden. Zum Vergleich werden Werte von MELHUIJSH⁽⁷²⁾ angeführt, der eine Schwankungsbreite von 9% in diesem Bereich findet.

Um eine endgültige Aussage zu treffen, wie weit die spektralen Verteilungen unter Einbeziehung der gesamten Apparatur übereinstimmen, d.h. unter Meßbedingungen, wurde folgende Untersuchung ausgeführt :

Ebenso wie die Küvette in der Quantenzähleranordnung wurde die Meßküvette mit einer Rhodamin B - Lösung gleicher Konzentration gefüllt. Ferner wurde vor dem Eingangsspalt des Emissionsmonochromators ein Kantenfilter RG 630 angebracht, um gleiche optische Bedingungen in beiden Zweigen des Gerätes zu schaffen. Dann wurde der übliche Vorgang einer Anregungsmessung durchgeführt. Bei idealen Bedingungen in beiden Zweigen der Apparatur dürfte man nun aufgrund gleicher optischer Voraussetzungen als Resultat der elektronischen Division eine Konstante erwarten.

Wie aus der Abb.11 hervorgeht, findet man im Wellenlängenbereich von 290 - 420 nm eine Schwankungsbreite von 4 - 5 % , im Bereich von 370 - 580 nm Abweichungen bis zu 3 % .

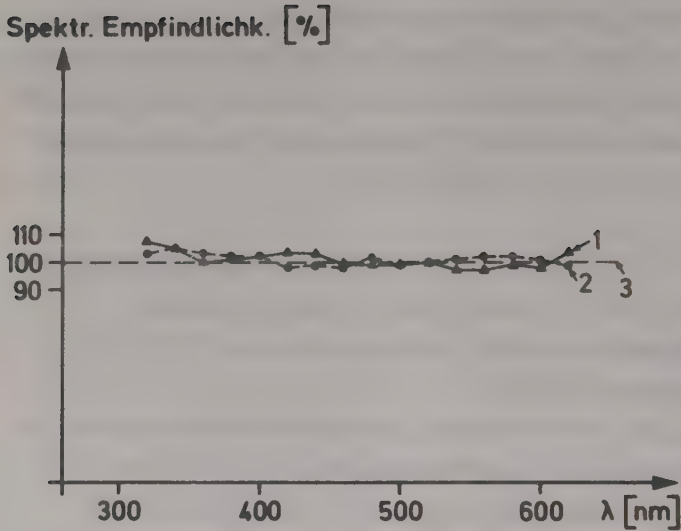


Abb.10 : Spektrale Empfindlichkeit der Quantenzähleranordnung ; 1 = Werte von MELHUISE⁽⁷²⁾, 2 = Werte von BOLDT⁽¹²⁾, 3 = Werte der Empfindlichkeit des Thermoelements (auf 100 % gesetzt). (vergl. Abb.19 (12))

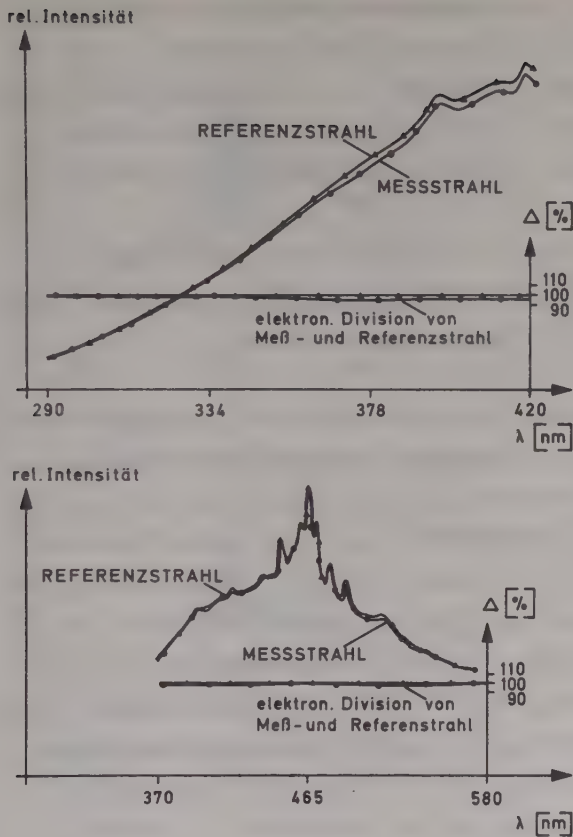


Abb.11 : Vergleich von Meß- und Referenzstrahl
unter Einbeziehung der gesamten Apparatur.

Um Fehler durch die elektronische Division auszuschalten, wurde diese numerisch überprüft und verifiziert.

Festgestellt wurde jedoch, daß bei geringfügiger Dejustierung, z.B. der Meßküvette im Meßzweig, der gerade beschriebene Abgleich zwischen Meß- und Referenzsignal stark verfälscht wird.

Hieraus kann auf eine positionsabhängige Anregung der Fluoreszenzleuchtquelle bzw. auf mangelhafte Homogenisierung der Anregungsstrahlung geschlossen werden.

Die Überprüfung des Homogenitätsgrades der Anregungsstrahlung wurde wieder mit Hilfe des Fotodetektors durchgeführt.

Dazu wurde der Fotodetektor bis auf eine Stichöffnung mit schwarzem Papier abgedeckt und das Spektrum des Anregungsstrahls an drei verschiedenen Stellen des Strahlquerschnitts, einmal direkt am Ausgang des Anregungsmonochromators, zum anderen direkt hinter dem Lichtleiter aufgenommen (Abb.12) .

Aus den Aufnahmen geht hervor, daß eine gewisse Homogenisierung der Anregungsstrahlung mit Hilfe der durchmischten Lichtleiterfasern erzielt wird, diese aber nicht ausreicht, um eine homogene Anregung in der Probenküvette zu garantieren.

Versuche, mit einer Ulbrichtschen Kugel einen höheren Homogenisierungsgrad zu erzielen, wurden wegen zu großer Intensitätsverluste aufgegeben.

Weitere Untersuchungen zur Homogenisierung der Anregungsstrahlung wurden nicht vorgenommen, da wir durch Einbau kontinuierlich justierbarer Geräte, wie Meßverschiebereiter mit Höhenfeinverstellung, eine relativ problemlose, exakte Justierung der Meßküvette vornehmen können.

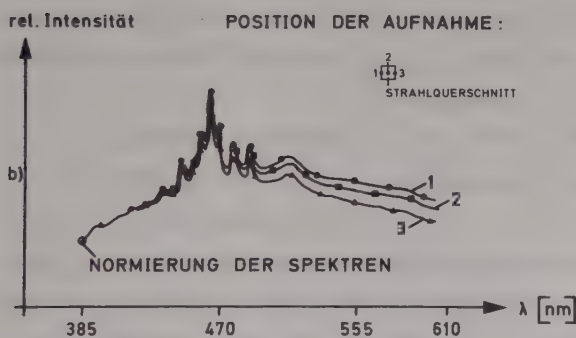
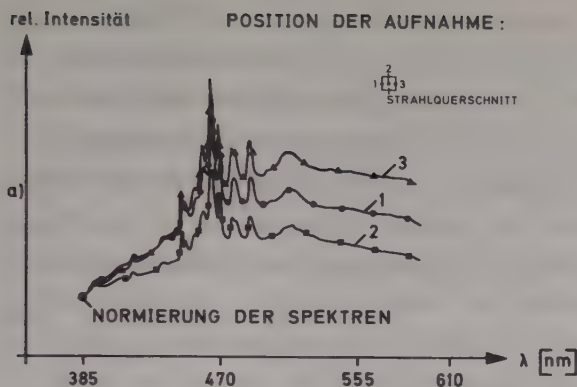


Abb.12 : Überprüfung des Homogenitätsgrades der Anregungsstrahlung durch Aufnahme der Spektren an drei verschiedenen Stellen des Strahlquerschnitts

a) am Ausgang des Anregungsmonochromators

b) direkt hinter dem Lichtleiter

Andere Fehler können durch die elektronische Division und Multiplikation, durch Nichtlinearität der Fotomultiplier und Spannungsdriften verursacht werden. Diese Fehler liegen aber unterhalb 1% , zum Teil bei wenigen Promille (siehe Abb.7, Kapitel 1.5.4), so daß sie gegen die schon angeführten Fehler vernachlässigt werden können. Von Bedeutung sind jedoch die statistischen Fehler, die im folgenden Abschnitt behandelt werden.

2.2 Statistische Fehler

Die statistischen Fehler des KSPF werden durch verschiedene Rauschkomponenten bedingt, wobei das Dunkelstromrauschen eine zentrale Stellung einnimmt.

2.2.1 Das Dunkelstromrauschen

Auch bei nicht beleuchteter Fotokathode des Fotomultipliers wird an der Anode ein Strom gemessen, der durch verschiedene Ursachen bedingt ist.

a) Thermische Emission

Die thermische Emission von Elektronen an der Kathode und an der ersten Dynode bildet den Hauptanteil des Dunkelstromes. Die Temperaturabhängigkeit ist für Nischthalbleiter-Kathoden durch die RICHARDSON-DUSHMAN-Gleichung⁽⁴⁹⁾ gegeben :

$$I_{DK} = A \cdot T^2 \cdot \exp\left(-\frac{\phi}{k \cdot T}\right) \quad (2.2.1-1)$$

mit : I_{DK} = Dunkelstrom an der Kathode

A = Materialkonstante

T = absolute Temperatur

ϕ = Elektronenaustrittsarbeit

k = BOLTZMANN-Konstante

Die thermische Emission von Elektronen ist ein statistischer Prozeß. Die Zahlen der in der Zeiteinheit emittierten Elektronen stellen eine POISSON-Verteilung dar. Die Standardabweichung vom Mittelwert ist ein Maß für das Rauschen. Es wird durch die Formel des Schrot-Rauschens⁽¹⁰⁾ dargestellt :

$$I_{DRK} = (2 \cdot e \cdot I_{DK} \cdot \Delta F)^{1/2} \quad (2.2.1-2)$$

mit : I_{DRK} = Dunkelstromrauschen an der Kathode (Effektivwert)

e = Elektronenladung

ΔF = Frequenzbandbreite

Im Vergleich mit den von der Kathode und der ersten Dynode emittierten Dunkelströmen sind die Beiträge zum Anodendunkelstrom durch die übrigen Dynoden sehr klein. Außerdem ist schon vom Material her die thermische Emission der Dynoden gering gegenüber derjenigen der Fotokathode⁽¹⁰⁸⁾. Der Rauschanteil des Anodendunkelstroms I_{DRA} ergibt sich zu :

$$I_{DRA} = g \cdot (2 \cdot e \cdot I_{DK} \cdot \frac{\sigma}{\sigma-1} \cdot \Delta F)^{1/2} \quad (2.2.1-3)$$

Hier sind : g = Verstärkungsfaktor des Fotomultipliers

σ = mittlerer Sekundäremissionsfaktor der

Dynoden

Mit dem Faktor $\delta/f-1$ wird die Zunahme des Rauschens durch Streuungen des Sekundäremissionsfaktors berücksichtigt. Aus der Gl.(2.2.1-3) ist zu ersehen, daß das Dunkelstromrauschen an der Anode durch das Frequenzband und den Sekundäremissionsfaktor bestimmt wird, ferner aber auch stark temperaturabhängig ist (siehe Gl.(2.2.1-1)).

Eine Abkühlung des Fotomultipliers Typ QB 9558 der Firma EMI von 25°C auf -15°C bewirkte eine Verringerung des Dunkelstromrauschens um 98%⁽¹¹⁾. Weitere Abkühlung ist nur mit geringer Rauschverminderung verbunden und führt überdies bei sehr tiefen Temperaturen zu einem Wiederanstieg des Rauschens durch andere Effekte^(121,122,12).

Eine weitere Verringerung des Dunkelstromrauschens kann durch Anlegen eines Magnetfeldes hinter der Fotokathode erzielt werden⁽⁸⁹⁾. Die relativ langsamen thermischen Elektronen werden dabei durch das Magnetfeld von der Ver-
vielfältigungsstrecke abgelenkt und schlagen auf den Außenmantel des Fotomultipliers. Wegen ihrer geringen kinetischen Energie sind sie dabei nicht imstande, Lumineszenz zu erregen.

b) Feldemission

Auch hohe Feldstärken können den Austritt von Elektronen aus Oberflächen bewirken. Besonders an scharfen Kanten und Spitzen können derartig hohe Feldstärken auftreten.

Nach SCHOTTKY erniedrigt sich durch eine äußere Feldstärke E

die Austrittsarbeit ϕ auf⁽³⁰⁾:

$$\phi_{\text{eff}} = \phi - (e^3 \cdot E)^{1/2} \quad (2.2.1-4)$$

Diese Feldkorrektur macht wegen des exponentiellen Eingehens in die RICHARDSON-DUSHMAN-Gleichung eine beträchtliche Erhöhung der Elektronenemission aus. Diesem Effekt kann aber durch Abrunden aller Kanten und Spitzen entgegengewirkt werden.

Bei den üblicherweise verwendeten Fotomultipliern ist die Feldstärke E jedoch so gering, daß der durch die Feldemission bewirkte Beitrag zur Erhöhung des Dunkelstromrauschens vernachlässigt werden kann.

c) Ionisierung des Restgases

Die in einem Fotomultiplier stets vorhandenen Restgasmoleküle können durch Elektronen ionisiert werden. Die positiven Ionen werden von den ersten Dynoden, mitunter auch von der Fotokathode, aufgefangen. Ist ihre Energie genügend hoch, dann lösen sie Elektronen aus.

Bei normalen Betriebsspannungen (800 - 1000 V) tritt diese Art der Generation jedoch fast nicht auf.

d) Lichtrückkopplung

Wenn Elektronen aus dem Vervielfachersystem heraustreten und auf den Glaskolben des Fotomultipliers auftreffen,

können sie Szintillationen hervorrufen. Wenn diese Lichtquanten die Fotokathode erreichen, werden zusätzlich Elektronen ausgelöst, die den Dunkelstrom erhöhen. Dieser Effekt kann durch Anlegen einer Suppressionsspannung weitestgehend ausgeschaltet werden. Eine Spannung, die annähernd so hoch ist wie die Kathodenspannung, wird dabei auf eine die Röhre von außen umgebende Schicht gelegt. In der bei uns verwendeten Anordnung verkleinert sich das gesamte Dunkelstromrauschen des Fotomultipliers 6094 B um mehr als 90% (12).

e) Natürliche Radioaktivität des Kolbenglases

Durch den Zerfall radioaktiver Isotope, die in natürlicher Beimengung im Kolbenglas des Fotomultipliers enthalten sind, kann ebenfalls ein Beitrag zum Dunkelstrom entstehen. Hauptsächlich handelt es sich dabei um das β - und γ -Strahlung aussendende Kalium-Isotop K 40, das in Kalium mit einem natürlichen Gehalt von 0,0119 % auftritt. Für die Kolben verwendet man daher Borsilikatgläser, die einen sehr geringen Kaliumgehalt aufweisen.

f) Isolationsströme

Isolationsströme in Fotovervielfachern werden hauptsächlich durch den Niederschlag von Alkalimetallen auf der Innenwand des Glaskolbens ermöglicht. Diese Niederschläge, die sich nie ganz vermeiden lassen, bilden leitende Verbindungen zwischen

den Elektrodenanschlüssen und Halterungen. Äußerlich kann durch Feuchtigkeit und Schmutz die Isolation zwischen den Sockelstiften verschlechtert werden.

2.2.2 Widerstands- und Verstärkerrauschen

Die Träger des Stromes, die Elektronen, sind der thermischen Bewegung unterworfen. Sie werden z.B. in höchst unregelmäßiger Weise von den Atomen des Leiters hin- und hergestoßen. Daher ist zu erwarten, daß auch der Strom kleine Amplituden um seinen Mittelwert ausführt.

Die am Widerstand R auftretende Rauschspannung berechnet sich nach NYQUIST⁽⁷⁾ zu :

$$U_{\text{Rauschen}} = 2 \cdot (k \cdot T \cdot R \cdot \Delta F)^{1/2} \quad (2.2.2-1)$$

Durch entsprechende Auslegung der elektronischen Schaltung kann aber auch dieser Beitrag klein gemacht werden.

2.2.3 Das Funkelrauschen

In der Literatur⁽⁹⁵⁾ wird über eine weitere Rauschkomponente berichtet, das sogenannte Funkelrauschen. Der Effektivwert dieses Rauschens wird durch folgende Gleichung angegeben⁽¹⁰⁾:

$$\overline{I_F^2} = K \cdot \frac{I^a}{F^b} \cdot \Delta F \quad (2.2.3 -1)$$

mit : I = Gleichstromanteil ; K = Konstante ; F = Frequenz
a, b = Exponenten, deren Wert ca. 1 ist.

Das Funkelrauschen ist also frequenzabhängig und zwar derart, daß der Rauschanteil bei niedrigen Frequenzen größer als bei hohen Frequenzen ist.

Da die Literatúraussagen über die Funkelrauschkomponente jedoch widersprüchlich sind^(85,90), hat BOLDT⁽¹²⁾ Untersuchungen über das Funkelrauschen angestellt.

Aufgrund dieser Messungen kann davon ausgegangen werden, daß weder im Betrieb mit Suppressionsspannung noch ohne eine Funkelrauschkomponente im Gebiet zwischen 0,2 und 200 Hz existiert.

2.2.4 Das Signalrauschen

Auch die Fotoemission von Elektronen an der Kathode des Fotomultipliers ist ein statistischer Prozess. Die Standardabweichung vom Mittelwert des Fotostromes wird als Signalrauschen bezeichnet und durch folgende Beziehung beschrieben⁽¹⁰⁸⁾:

$$S_{RA} = g \cdot (2 \cdot e \cdot S_K \cdot \frac{f}{f-1} \cdot \Delta F)^{1/2} \quad (2.2.4-1)$$

Hierbei sind : S_K = Signalstrom an der Kathode

S_{RA} = Signalrauschen an der Anode

Trägt man einmal das Signal an der Anode, $S_A = g \cdot S_K$ und das Signalrauschen an der Anode S_{RA} gegen das Signal an der Kathode auf, wobei angenommen wird, daß nur der statistische Prozess der Fotoemission das Anodensignal verrauscht,

so erkennt man, daß für genügend kleine Signale an der Kathode der Effektivwert des Signalrauschens an der Anode größer wird als das eigentliche Signal (Abb.13) .

Ein Wertebeispiel soll dies verdeutlichen :

Wenn : $S_K = 2 \cdot e \cdot \frac{f}{f-1} \cdot \Delta F$, dann gilt : $S_A = S_{RA}$.

Mit $g = 10^6$, $\Delta F = 10\text{Hz}$ und $\frac{f}{f-1} \approx 1$ folgt : $S_A = S_{RA} = 3 \cdot 10^{-12} \text{A}$.

Für Signalströme an der Kathode, die kleiner als

$(2 \cdot e \cdot \frac{f}{f-1} \cdot \Delta F)$ sind, gilt damit : $S_{RA} > S_A$.

Um ein noch auswertbares Anodensignal zu erhalten, sollten die Schwankungen $\pm 10\%$ nicht übersteigen. Das bedeutet für unser Wertebeispiel, daß der Anodenstrom die Größenordnung $3 \cdot 10^{-10} \text{A}$ haben muß, bei Vernachlässigung anderer Rauscheinflüsse. Demzufolge wird die Nachweisempfindlichkeit unserer Anordnung bei kleinsten Signalen durch den statistischen Fehler des Signalrauschens begrenzt.

Neben einer schmalen Frequenzbandbreite und geringer Streuung des Sekundäremissionsfaktors besteht die einzige Möglichkeit, die Empfindlichkeit des KSPF zu erhöhen, in einer energiereicheren Anregung der Fluoreszenzleuchtquelle. Im Hinblick auf biologisch-medizinische Anwendungen sind hier jedoch Grenzen gesetzt.

2.3 Messung der Empfindlichkeit

Die maximale Empfindlichkeit eines Spektrofluorometers kann definiert werden als die gerade noch meßbare Quantität eines Stoffes. Damit man sicher ist, daß ein Signal existiert,

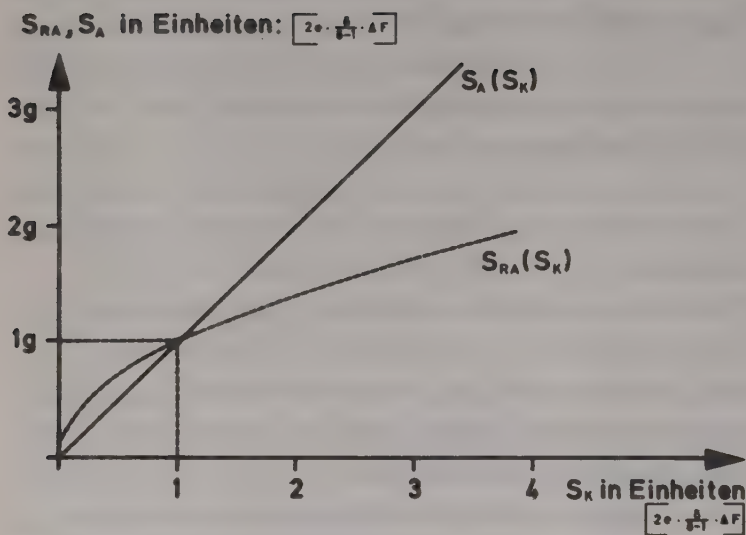


Abb.13 : Signalrauschen S_{RA} und Signal S_A an der Anode des Fotomultipliers als Funktion des Kathodensignals S_K .

das von dem zu untersuchenden Stoff herrührt, muß ein Signal-Rauschverhältnis von mindestens 10 : 1 vorliegen. Um eine maximale Empfindlichkeit zu erzielen kann man nicht umhin, die spektrale Auflösung bis zu einem bestimmten Grade zu opfern. Die Bandbreite der Anregungsstrahlung wird daher vergrößert, um eine Erhöhung der einfallenden Energie und damit eine intensivere Fluoreszenzstrahlung zu erhalten.

Bei Chininsulfat ist eine hohe Auflösung nicht erforderlich, da die Schwingungsübergänge zwischen dem angeregten und dem Grundzustand energetisch nicht scharf definiert sind, so daß das Fluoreszenzspektrum als breites Band erscheint. Eine Verkleinerung der Bandbreite würde daher die Auflösung nicht erhöhen.

Zur Messung der Empfindlichkeit wurden an Chininsulfat, gelöst in 0,1n H_2SO_4 , unkorrigierte Emissionsspektren aufgenommen. Diese Spektren können mit Untersuchungen über die Empfindlichkeit des AMINCO-BOWMAN-Spektrofotofluorometers⁽³⁾ verglichen werden. Bei Chininsulfat spielt die Lichtstreuung eine wichtige Rolle, wenn Konzentrationen nahe der Grenze der Detektierbarkeit analysiert werden. So erscheint die Fluoreszenz der Probe als eine "Schulter", die der Raman-Bande bei 400nm überlagert ist (Abb.14). Bei einer Konzentration von 1ng/ml, entsprechend 1PPB, erhielten wir ein Signalverhältnis von Raman-Peak S_2 zu S_1 bei $\lambda = 450\text{nm}$ von :

$$S_2/S_1 = 3,4$$

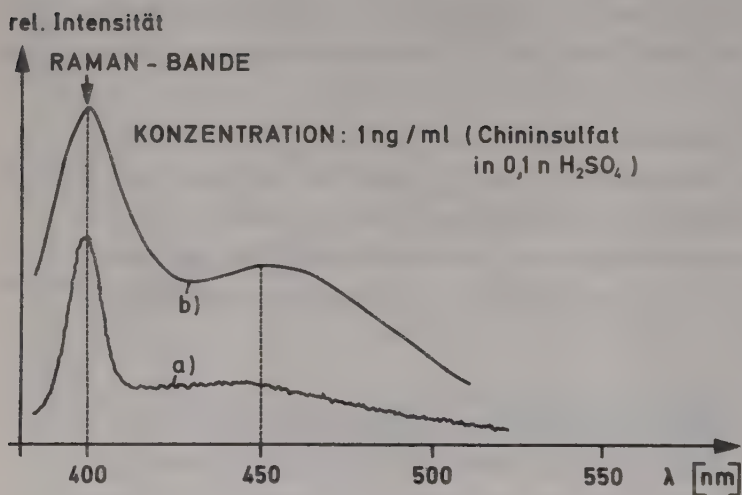


Abb.14 : Messung der Empfindlichkeit des

- a) korrigiert messenden Spektrofluorometers
- verglichen mit der Empfindlichkeit des
- b) AMINCO-BOWMAN-Spektrofluorometers

Aus der Studie über die Empfindlichkeit des AMINCO-BOWMAN-Spektrofotofluorometers läßt sich folgendes Verhältnis bestimmen :

$$S_2 / S_1 = 1,7$$

Die Empfindlichkeit beider Geräte liegt somit in der selben Größenordnung. Es muß aber betont werden, daß ein Vergleich zwischen beiden Fluorometern nur bedingt möglich ist, da wir die Probe unter Umständen bei einer anderen Temperatur untersucht haben, als es in der Studie über das AMINCO-BOWMAN-Gerät erfolgt ist. Darüberhinaus kann wegen unterschiedlicher Verunreinigungen der Proben und unterschiedlicher Intensität der Anregungsstrahlung über den Vergleich der Größenordnung hinaus keine genauere Qualifikation eines der beiden Geräte vorgenommen werden.

3. Kapitel : Theoretische Betrachtungen und experimentelle Befunde verschiedener Autoren zur Empfindlichkeit anderer lichtdetektierbarer Methoden.

Neben der bei dem KSPF realisierten Gleichstrommessung existieren drei weitere Methoden, die zur fotometrischen Lichtmessung eingesetzt werden. Diese sind die Methoden :

- 1) die phasenempfindliche Messung
- 2) die Rauschmessung
- 3) die Einzelphotonenzählung

Besonders die beiden letzteren Methoden werden von verschiedenen Autoren^(2,4,84,85) zur Messung sehr schwacher Lichtintensitäten empfohlen. Darüberhinaus werden verschiedene Kombinationsmöglichkeiten dieser Methoden vorgeschlagen, um das Signal-Rauschverhältnis zu verbessern. So empfiehlt CLEARY⁽²⁰⁾ eine Kombination aus Rauschmessung und phasenempfindlicher Messung, ALFANO und OCKMAN⁽²⁾ schlagen vor, die Rauschmessung mit der Photonenzählung zu verbinden.

Es sei jedoch schon an dieser Stelle hervorgehoben, daß die Meinungen der Autoren hinsichtlich der Empfindlichkeit und damit hinsichtlich der Diskriminierung der einzelnen Methoden gegen die unterschiedlichen Rauschkomponenten weitgehend schwanken. Diese mangelnde Übereinstimmung wird am Ende des Kapitels anhand von Meßergebnissen aus der Literatur aufgezeigt und diskutiert. Zunächst wird ein

Überblick über die Methoden gegeben und das theoretische Signal-Rauschverhältnis mitgeteilt.

3.1 Die phasenempfindliche Messung

Die phasenempfindliche Messung unterscheidet sich von der Gleichstrommessung nur insofern, als das optische Meßsignal mittels einer Blende (chopper) periodisch unterbrochen wird und nur die Signale mit der Unterbrecherfrequenz verstärkt werden.

Der Vorteil dieser Anordnung ist die Unterdrückung des Gleichstromanteils des Dunkelstroms. Bei der Gleichstrommessung kann jedoch auch durch entsprechende Auslegung der elektronischen Schaltung der Gleichstromanteil des Dunkelstroms kompensiert werden⁽¹⁰⁸⁾, wie es auch in unserer Anordnung realisiert wurde (siehe Kapitel 1.5.5) .

Nachteil der Gleichstrommessung ist, daß die Gleichstromverstärker weniger stabil sind als die Wechselstromverstärker.

Betrachtet werden soll nun, ob sich das Signal-Rauschverhältnis beider Methoden unterscheidet. Dazu berücksichtigen wir nur die Rauschanteile, die durch das Signal und den Dunkelstrom bedingt sind. Insbesondere vernachlässigen wir auch den Term $\delta/\delta-1$ in den Gleichungen (2.2.1-3) und (2.2.4-1), der durch Schwankungen des Sekundäremissionsfaktors δ bedingt ist.

Dann ergibt sich das Rauschen an der Anode des Fotomultipliers durch Addition der beiden Komponenten zu :

$$R = (2 \cdot e \cdot g \cdot (S_A + I_{DA}) \cdot \Delta F)^{1/2} \quad (3.1-1)$$

Hierbei ist I_{DA} der Dunkelstrom an der Anode des Fotomultipliers, für den gilt: $I_{DA} = g \cdot I_{DK}$.

Für das Signal-Rauschverhältnis der Gleichstrommessung folgt damit:

$$(S/R)_G = S_A / (2 \cdot e \cdot g \cdot (S_A + I_{DA}) \cdot \Delta F)^{1/2} \quad (3.1-2)$$

Bei der phasenempfindlichen Messung schwingt der Anodenstrom des Fotomultipliers zwischen I_{DA} und $I_{DA} + S_A$.

Wenn die Wellenform rechtwinklig ist und die Signal- und Dunkelstromperioden gleich lang sind, dann ist der mittlere Signalstrom $S_A/2$. Für das Signal-Rauschverhältnis der phasenempfindlichen Messung folgt somit:

$$(S/R)_P = S_A / (8 \cdot e \cdot g \cdot (S_A/2 + I_{DA}) \cdot \Delta F)^{1/2} \quad (3.1-3)$$

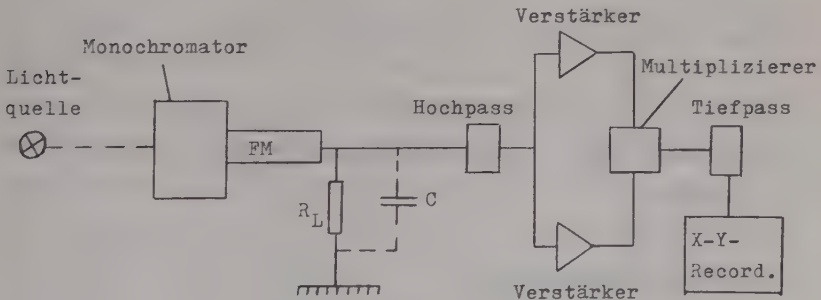
Bei einem Fotomultiplier reduziert daher die periodische Signalunterbrechung das theoretische Signal-Rauschverhältnis um einen Faktor $1/\sqrt{2}$, wenn $S_A \gg I_{DA}$, bzw. um einen Faktor $1/2$, wenn $S_A \ll I_{DA}$.

3.2 Die Rauschmessung

Eine neue Methode zur Messung schwacher Lichtsignale wurde durch Y.H. PAO und Mitarbeiter^(84,85) vorgestellt. Diese Methode bestimmt das gewünschte Signal indirekt über das zugehörige

Signalrauschen. Bekanntlich besteht der Ausgangsstrom eines Fotomultipliers, der mit Licht bestrahlt wird, aus einer Gleichstromkomponente, welche gewöhnlich als das Signal bezeichnet wird und einem Wechselstromanteil, der als Rauschen bezeichnet wird. Die Tatsache, daß bei genügend schwachen Lichtintensitäten mehr Leistung im Wechselstromanteil als im Gleichstromanteil des Leistungsspektrums ist, nehmen die Autoren zum Anlaß, das kleinere Signal zu ignorieren und statt dessen die gewünschte Information über das einfallende Licht durch die Messung des Rauschens zu bestimmen.

Die schematische Darstellung der von PAO, ZITTER und GRIFFITHS vorgeschlagenen Anordnung sieht wie folgt aus :



Der Gleichspannungsanteil der Fotomultiplierspannung wird durch ein Hochpassfilter eliminiert. Der Wechselspannungsanteil wird durch zwei parallele Breitbandverstärker geschickt und anschließend multipliziert, um $(\int V)^2$ zu erzielen. Ein nachfolgendes Tiefpassfilter selektiert den Gleichspannungs-

anteil des Ensembles $(\delta V)^2$, der weiter auf einen Schreiber geführt wird. Dieses aufgezeichnete Signal ist proportional der Leistung des Signalrauschens am Ausgang des Fotomultipliers, folglich ist es auch proportional der Emissionsrate an Fotoelektronen und damit dem ursprünglichen Lichtsignal. Die Beiträge durch Verstärkerrauschen werden in dieser Anordnung größtenteils reduziert, da das Rauschen der parallelen Verstärker unkorreliert zueinander ist.

Das Fotomultiplier-Dunkelstromrauschen und das Widerstandsrauschen werden jedoch auf die selbe Weise verarbeitet wie das Signalrauschen, wodurch die Empfindlichkeitsgrenze dieser Anordnung bestimmt wird.

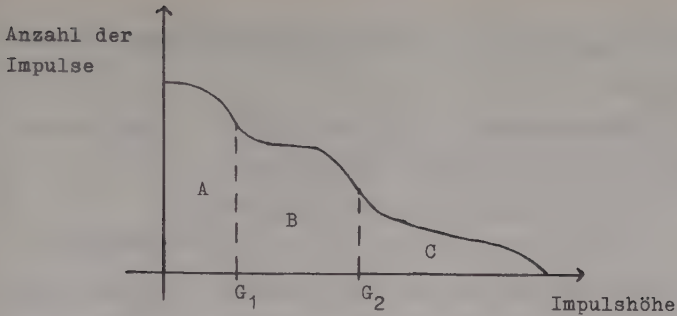
Für das Signal-Rauschverhältnis dieser Methode haben ALFANO und OCKMAN⁽²⁾ folgende Beziehung abgeleitet :

$$(S/R)_{Ra} = 2 \cdot S_A / (e \cdot g \cdot (S_A + I_{DA}) \cdot \Delta F)^{1/2} \quad (3.2-1)$$

Der Theorie nach wäre also das Signal-Rauschverhältnis dieser Methode dem der Gleichstrommessung um einen Faktor $2 \cdot \sqrt{2}$ überlegen.

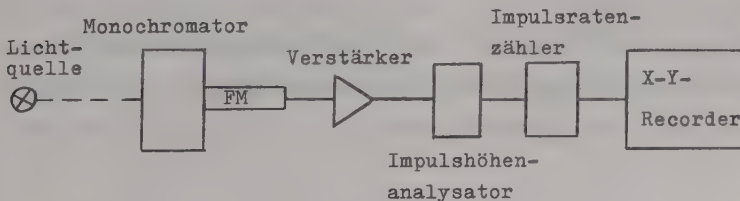
3.3 Die Einzelphotonenzählung

Die vierte Methode zur Messung schwacher Lichtsignale ist die Einzelphotonenzählung⁽³³⁾. Grundlage dieser Methode ist die unterschiedliche Impulshöhenverteilung von z.B. Dunkelstromimpulsen und Signalstromimpulsen am Ausgang des Fotomultipliers⁽⁸⁹⁾, wie die nachstehende Abbildung zeigt :



Der Bereich A der Abbildung schließt Impulse ein, die an den Dynoden entstehen und daher weniger verstärkt werden als Impulse durch einzelne Elektronen von der Kathode. Der Bereich B repräsentiert die eigentliche Elektronen-Impulshöhenverteilung, in der die Einzelphotonen-Signalsimpulse erscheinen. Der Bereich C wird hervorgerufen durch kosmische Strahlen, Nachimpulse und radioaktive Elemente im Material des Fotomultipliers.

Um das Verhältnis der Signalimpulse zu den Rauschimpulsen zu maximieren, wird ein Impulshöhenanalysator eingesetzt, der Impulse innerhalb eines vorbestimmten Amplitudenbereichs selektiert. In der Abbildung liegt dieser Bereich innerhalb der Grenzen G_1 und G_2 . Die ausgewählten Impulse werden dann über einen Impulsratenzähler auf einen Schreiber geführt. Eine schematische Anordnung dieser Methode zeigt die nachfolgende Abbildung :



Die Anzahl der Signalimpulse N_a , die zur Anode gelangen, ist gegeben durch :

$$N_a = N_p \cdot \eta(\lambda)$$

Dabei ist N_p die Anzahl der Photonen, die auf die Fotokathode treffen und $\eta(\lambda)$ ist die Quantenausbeute der Fotokathode bei der Wellenlänge λ des einfallenden Lichtes.

Wegen der endlichen Auflösungszeit τ des Fotomultipliers wird die gemessene Impulsrate immer niedriger sein als die wahre, da zwei Photonen, die während der Auflösungszeit τ auf die Fotokathode treffen, nur als Einzelimpuls gewertet werden⁽¹⁰⁶⁾. Um die wahre Impulsrate n_w aus der gemessenen n_a zu erhalten, gibt EVANS⁽²⁸⁾ für $n_w \cdot \tau \ll 1$ folgende Korrekturformel an :

$$n_w = n_a \cdot (1 + n_a \cdot \tau)$$

THAER und SERNETZ⁽¹⁰⁴⁾ empfehlen als schnelle Fotomultiplier bei der Einzelphotonenzählung den AMPEREX 56 DUVP oder den RCA 8575 mit einer Auflösungszeit in der Größenordnung von einigen hundert Pikosekunden.

Die Signalimpulse an der Anode haben eine mittlere Impulsamplitude Q_A von : $Q_A = e \cdot g$, wenn g die Verstärkung des Fotomultipliers ist.

ALFANO und OCKMAN⁽²⁾ geben für das Signal-Rauschverhältnis der Einzelphotonenzählung folgende Beziehung an :

$$(S/R)_E = n_s \cdot \tau / ((n_s + n_d) \cdot \tau)^{1/2} \quad (3.3-1)$$

Hierbei sind : τ = Zeitkonstante des Impulsratenzählers

n_d = Anzahl der Dunkelstromimpulse pro sec

n_s = Anzahl der Signalimpulse pro sec

Setzt man $S_A' = n_s \cdot e \cdot g$, $I_{DA}' = n_d \cdot e \cdot g$ und $\Delta F' = \frac{1}{\tau}$,

so erhält man einen zu den anderen Beziehungen äquivalenten Ausdruck für das Signal-Rauschverhältnis :

$$(S/R)_E = S_A' / (e \cdot g \cdot (S_A' + I_{DA}') \cdot \Delta F')^{1/2} \quad (3.3-2)$$

Da man die Zeitkonstante τ des Impulsratenzählers relativ groß wählen kann und da die Methode der Einzelphotonenzählung gegen das Rauschen der Dunkelstromimpulse diskriminiert, ist auch mit dieser Methode theoretisch ein Gewinn an Empfindlichkeit zu erwarten, insbesondere im Vergleich mit der phasenempfindlichen Messung und der Gleichstrommessung.

3.4 Vergleich der theoretischen Signal-Rauschverhältnisse mit experimentellen Daten aus der Literatur

In diesem Abschnitt werden die theoretischen Signal-Rauschverhältnisse der einzelnen Methoden mit experimentellen Daten aus der Literatur verglichen.

ANDERSON und CLEARY⁽⁴⁾ untersuchten unter anderem die Gleichstrommessung, die phasenempfindliche Messung und die Rausch-

messung unter weitestgehend gleichen Bedingungen wie äquivalente Frequenzbandbreite und gleiche konstante Lichtintensität. Wie zu erwarten war weicht bei ihnen das experimentell bestimmte Signal-Rauschverhältnis vom theoretischen ab, da bei letzterem nur die Rauscheinflüsse des Signals und des Dunkelstroms berücksichtigt wurden. Für die Gleichstrommessung ist das theoretische Signal-Rauschverhältnis um etwa einen Faktor 10 größer als das experimentell bestimmte. Das der Rauschmessung überwiegt um einen Faktor 2,5 und das der phasenempfindlichen Messung um ca. den Faktor 3. Die experimentellen Befunde zeigen weiter, daß die Rauschmessung um den Faktor 4 empfindlicher ist als die Gleichstrommessung und um ca. einen Faktor 3 empfindlicher ist als die phasenempfindliche Messung.

Diese Resultate stehen auch im Einklang mit den theoretischen Untersuchungen von PAO und GRIFFITHS⁽⁸⁴⁾, die zeigen, daß die Rauschmessung das Funkelrauschen verringert, also die $(1/f)$ - Komponente des Rauschens und ebenso das Dunkelstromrauschen, wenn der Signalstrom kleiner ist als der Dunkelstrom und der Dunkelstrom weniger verstärkt wird als der Signalstrom. Auffallend ist bei ANDERSON und CLEARY jedoch die Diskrepanz im Signal-Rauschverhältnis zwischen Theorie und Experiment bei der Gleichstrommessung. Offenbar diskriminiert ihre Anordnung demnach am wenigsten gegen Rauscheinflüsse wie Verstärker-, Widerstands- und Funkelrauschen.

ALFANO und OCKMAN⁽²⁾ kommen zu ähnlichen Resultaten wie ANDERSON und CLEARY, allerdings vergleichen sie statt der Gleichstrommessung die Einzelphotonenzählung mit den beiden anderen Methoden. Ihren Untersuchungsergebnissen zufolge ist die Einzelphotonenzählung um einen Faktor 4 empfindlicher als die phasenempfindliche Messung, jedoch nur geringfügig empfindlicher als die Rauschmessung (ca. Faktor 1,2) . Als kleinstes meßbares Signal geben sie bei der phasenempfindlichen Messung $1,4 \cdot 10^{-12} \text{ A}$ an, was einer Lichtleistung von $5,7 \cdot 10^{-17} \text{ W}$ entspricht. Für die Rauschmessung finden sie $1 \cdot 10^{-12} \text{ A}$, entsprechend $4 \cdot 10^{-17} \text{ W}$ und für die Einzelphotonenzählung geben sie 2 Impulse/sec an, entsprechend $3,2 \cdot 10^{-13} \text{ A}$ oder $1,3 \cdot 10^{-17} \text{ W}$. Die Überlegenheit der Rauschmessung gegenüber der phasenempfindlichen Messung erklären die Autoren durch Reduzierung der Funkelrauschkomponente. Die hohe Empfindlichkeit der Einzelphotonenzählung liegt ihrer Meinung nach in der relativ einfachen Vergrößerung der Zeitkonstante begründet, was unmittelbar zu einem Anstieg des Signal-Rauschverhältnisses führt (siehe Gl.(3.3-1)) .

Im Gegensatz zu den Befunden der schon zitierten Autoren stehen experimentelle Ergebnisse zahlreicher weiterer Autoren. So findet ROBBEN⁽⁹⁰⁾, daß das Signal-Rauschverhältnis der Einzelphotonenzählung dem der Gleichstrommessung vergleichbar ist, mit einem geringen Vorteil der Einzelphotonenzählung bei langen Meßzeiten (große Zeitkonstante τ) . Bei den von ihm untersuchten Fotomultipliern konnte er keinen Rauschanstieg bei niedrigen Frequenzen feststellen, was auf

das Fehlen einer Funkelrauschkomponente bei Fotomultipliern hinweist, wie auch von BOLDT⁽¹²⁾ bestätigt wurde.

Zu ähnlichen Resultaten kamen auch ROLFE und MOORE⁽⁹¹⁾ sowie AKINS und Mitarbeiter⁽¹⁾.

NAKAMURA und SCHWARZ⁽⁷⁴⁾ untersuchten das Signal-Rausch-verhältnis der Einzelphotonenzählung und der phasenempfindlichen Messung. Sie kommen zu dem Resultat, daß auch diese beiden Methoden experimentell vergleichbar sind. Auch andere Autoren^(86,106,123) können diese Auffassung bestätigen.

Eine eindeutige Entscheidung, welche der angeführten Lichtmeßmethoden die höchste Empfindlichkeit aufweist, kann wegen der widersprüchlichen Angaben nicht getroffen werden. Aufgrund der Untersuchungsergebnisse von BOLDT und ROBBEN, die keine Funkelrauschkomponente bei Fotomultipliern fanden, ist jedoch zu bezweifeln, daß die phasenempfindliche Messung und die Rauschmessung, die ja angeblich gegen das Funkelrauschen diskriminieren, empfindlicher sind als die Gleichstrommessung.

Dagegen scheint die Einzelphotonenzählung bei großen Zeitkonstanten τ als einzige Methode, verglichen mit der Gleichstrommessung, die Möglichkeit zu bieten, das Signal-Rausch-verhältnis zu verbessern.

Die Problematik der Messung sehr geringer Lichtintensitäten, wie sie beispielsweise in der Astronomie bei der Untersuchung schwach leuchtender Himmelskörper auftritt, schien uns auf

dem Gebiet der Fluoreszenzindikatoren jedoch nicht derartig zwingend, um eigene Untersuchungen zur Klärung der Frage nach der Empfindlichkeit der beiden Methoden durchzuführen. In der Tat haben wir in gewissen Grenzen die Möglichkeit, entweder durch Konzentrationserhöhung und/oder durch energiereichere Anregung der Fluoreszenzleuchtquelle, Einfluß auf die Intensität des Fluoreszenzlichts zu nehmen und somit das Signal-Rauschverhältnis zu erhöhen.

4. Kapitel : Methodische Entwicklung der Fluoreszenzphotometrie mit Indikatoren.

Fluoreszenzindikatoren^(42,47,54,79,107) werden in der chemischen Analyse in der selben Weise verwendet wie Farbindikatoren, nämlich zur Indikation des Endpunktes der Titration^(45,51,52). Die chemischen Prinzipien beider Indikatoren sind grundsätzlich identisch, mit Ausnahme der physikalischen Ursache für das Entstehen der Farbe. Fluoreszenzindikatoren werden vorwiegend in dunklen oder stark gefärbten Lösungen verwandt, wo Farbindikatoren schlecht zu erkennen sind bzw. nur geringe Empfindlichkeit zeigen. Die Fluoreszenzindikatoren werden herkömmlich in vier Klassen eingeteilt⁽³⁸⁾:

- 1) in Säure-Base Indikatoren, welche die Fluoreszenz in Abhängigkeit vom pH-Wert ändern,
- 2) in Oxidations-Reduktions Indikatoren, bei denen die Fluoreszenzänderung durch die Oxidation des Moleküls bedingt ist,
- 3) in Adsorptions-Indikatoren, deren Adsorption eine Änderung der Fluoreszenz hervorruft und
- 4) in metallochromische Indikatoren, bei denen eine Änderung der Fluoreszenz auftritt, wenn eine Konzentrationsänderung der in Lösung befindlichen Metallionen erfolgt.

In neuerer Zeit hat sich die Anwendung der Fluoreszenzindikatoren weiter ausgebreitet. So wird in der Literatur^(21,22)

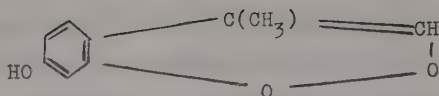
von Potentialindikatoren berichtet^(24,27,40,103), die ihre Fluoreszenz in Abhängigkeit von der elektrischen Feldstärke ändern. Von besonderem Interesse für uns war ferner die Mitteilung von VAUGHAN und WEBER⁽¹⁰⁹⁾, die die Fluoreszenzlöschung der Pyrenbuttersäure durch Sauerstoff entdeckten. Im Hinblick auf eine methodische Entwicklung der Fluoreszenzfotometrie mit Indikatoren zur Messung physiologischer Parameter, haben wir zwei Fluoreszenzindikatoren eingehender untersucht. Dieses sind die Indikatoren :

- a) β -Methylumbelliferon (pH-Indikator)
- b) Pyrenbuttersäure (O_2 -Indikator)

Vor der eigentlichen Anwendung der Fluoreszenzfotometrie mit Indikatoren, die im 5. Kapitel beschrieben wird, war es erforderlich, typische Eigenschaften dieser Indikatoren zu studieren. Die Ergebnisse dieser Voruntersuchungen sollen in diesem Kapitel dargestellt werden.

4.1 Messungen mit β -Methylumbelliferon

Unter der Vielzahl der in der Literatur aufgeführten pH-Indikatoren schien uns besonders das β -Methylumbelliferon⁽¹⁴⁾ (Fluka AG, Schweiz) interessant, da es sein Spektrum im physiologisch relevanten pH-Wertbereich ändert^(12,17) und überdies eine relativ hohe Quantenausbeute (ca. 70%) besitzt⁽¹⁷⁾. β -Methylumbelliferon, $C_{10}H_8O_3$, ein Coumarin-Derivat mit der Strukturformel :



ist fast unlöslich in kaltem, schwer löslich in kochendem Wasser. Es ist leicht löslich in Alkohol, Eisessig und Ammoniak sowie kaustischen Alkalien, wenig löslich in kohlensauren Alkalien. Wegen seiner unterschiedlichen Löslichkeit im Sauren und Alkalischen wurde zunächst untersucht, ob eine Konzentrationsabhängigkeit der Anregungsspektren vorlag.

4.1.1 Bestimmung des konzentrationsunabhängigen Bereichs der Anregungsspektren

Der qualitative Nachweis der Konzentrationsabhängigkeit der Anregungsspektren wird mit einer gesättigten, wässrigen β -Methylumbelliferon Lösung erbracht, die schrittweise verdünnt wird. Der pH-Wert der Lösung wurde mit Phosphatpuffer auf 7 eingestellt. Abb. 15 zeigt die Formänderung der Anregungsspektren in Abhängigkeit von der Konzentration bei konstantem pH-Wert 7. Die Aufnahme der Spektren erfolgte bei einer Emissionswellenlänge von $\lambda_{em} = 445\text{nm}$.

Die Änderung der Spektren kann durch einen Formfaktor F erfaßt werden, der den Verlauf der Spektren charakterisiert. Dieser Formfaktor wird gebildet als Quotient der Differenz zweier Signale S_1 und S_2 und dem Normierungssignal S_1 . Die Signale S_1 und S_2 gehören dabei zu Wellenlängen,

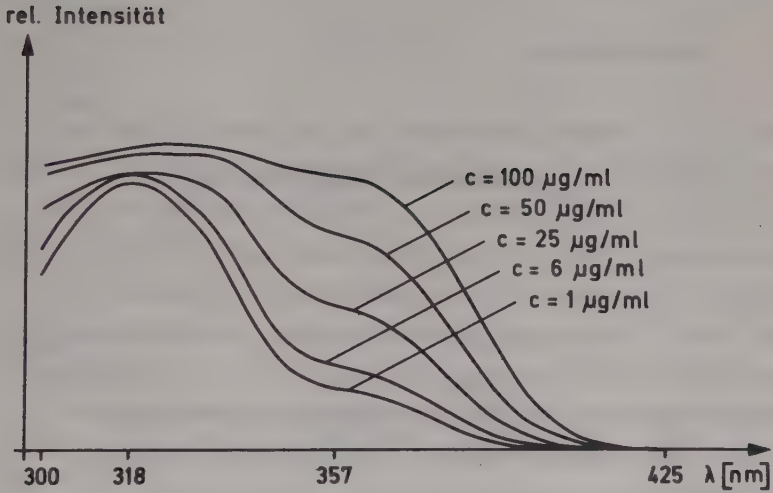


Abb.15 : Änderung der Anregungsspektren des
β-Methylumbelliferon in Abhängigkeit
von der Konzentration. ($\lambda_{em} = 445\text{nm}$)

zwischen denen die Änderungen des spektralen Verlaufs maximal werden. Wie aus der Abb. 15 zu entnehmen ist, sind das die Wellenlängen $\lambda_1 = 318\text{nm}$ und $\lambda_2 = 357\text{nm}$.

$$F(c) = \frac{S_1(\lambda_1) - S_2(\lambda_2)}{S_1(\lambda_1)} \quad (4.1.1-1)$$

mit c = Konzentration .

Durch diesen Modus der Auftragung sind die Anregungsspektren gegen Änderungen der apparativen Verstärkung invariant. In Abb. 16 wurde der Formfaktor als Funktion der Konzentration aufgetragen. Der Abbildung ist zu entnehmen, daß für Konzentrationen $c_g \leq 1 \mu\text{g/ml}$ einer wässrigen β -Methylumbelliferon Lösung die Anregungsspektren konzentrationsunabhängig werden. Diese Konzentrationsgrenze wurde auch bei verschiedenen pH-Werten im physiologisch relevanten pH-Wertbereich von 5 bis 8 aufgefunden. Bei Variation der Pufferkonzentration der untersuchten Lösungen konnte keine Änderung des Formfaktors festgestellt werden.

Da die Löslichkeitsgrenze des β -Methylumbelliferon in H_2O bei etwa $100 \mu\text{g/ml}$ liegt, werden, wegen der höheren Genauigkeit bei der Einwaage, 50mg abgewogen und in 1l H_2O gelöst. Anschließend erfolgt die Verdünnung auf $1 \mu\text{g/ml}$. Die Einstellung des pH-Wertes mit Phosphatpuffer wird im Verhältnis 1:1 mit der β -Methylumbelliferon Lösung vorgenommen, so daß jeweils nur die Konzentration $0,5 \mu\text{g/ml}$ vermessen wird. Diese Konzentration der Lösung erweist sich

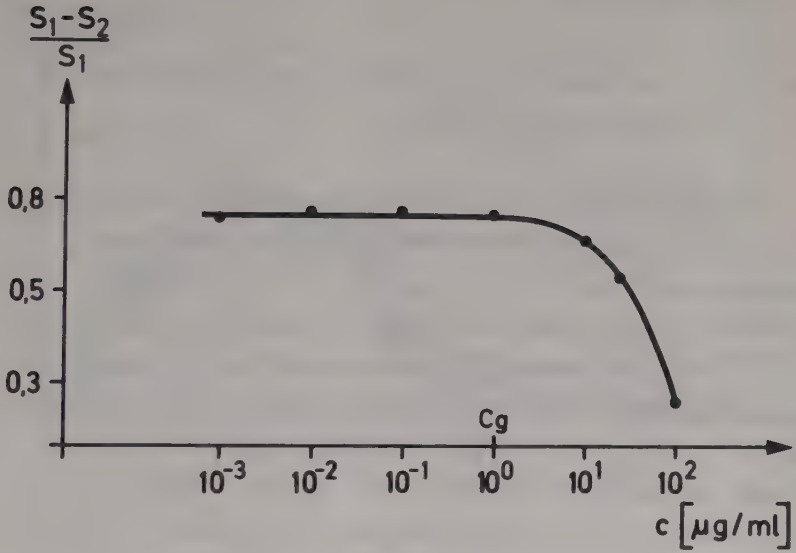


Abb.16 : Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit
der Anregungsspektren des β -Methylumbelliferon
mit Hilfe des Formfaktors: $F(c) = S_1 - S_2 / S_1$

für spektrofluorometrische Messungen als hinreichend groß. Mit der Kenntnis des konzentrationsunabhängigen Bereichs der Anregungsspektren war es nun möglich, die pH-Wertabhängigkeit der Spektren eindeutig zu bestimmen und in einer Eichkurve aufzutragen.

4.1.2 pH-Wertabhängigkeit und Eichkurve der Anregungsspektren des β -Methylumbelliferon

Die pH-Wertabhängigkeit der Anregungsspektren des β -Methylumbelliferon wurde bei unkritischen Konzentrationen des Indikators untersucht. Wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, wurden die pH-Werte mit Phosphatpuffer eingestellt.

Abb. 17 zeigt die Änderung der Anregungsspektren in Abhängigkeit vom pH-Wert, wieder bei der charakteristischen Emissionswellenlänge $\lambda_{em} = 445\text{nm}$. Die charakteristischen Wellenlängen der Anregung liegen auch hier bei $\lambda_1 = 318\text{nm}$ und $\lambda_2 = 357\text{nm}$. Mit Hilfe des Formfaktors als Funktion des pH-Wertes wurde eine Eichkurve aufgestellt, die gut durch ein Polynom 6. Grades approximiert werden konnte (Abb. 18).

$$y = F(\text{pH}) = A_1 + A_2 \cdot (\text{pH})^1 + A_3 \cdot (\text{pH})^2 + A_4 \cdot (\text{pH})^3 + A_5 \cdot (\text{pH})^4 + A_6 \cdot (\text{pH})^5 + A_7 \cdot (\text{pH})^6$$

Für die Koeffizienten fanden wir :

$$\begin{array}{ll} A_1 = - 0,483\ 575\ 6446\ 10^3 & A_5 = 0,365\ 873\ 1543\ 10^0 \\ A_2 = 0,346\ 649\ 3113\ 10^3 & A_6 = - 0,944\ 268\ 9229\ 10^{-1} \\ A_3 = - 0,865\ 586\ 6337\ 10^2 & A_7 = 0,396\ 565\ 0469\ 10^{-2} \\ A_4 = 0,742\ 811\ 9982\ 10^1 & \end{array}$$

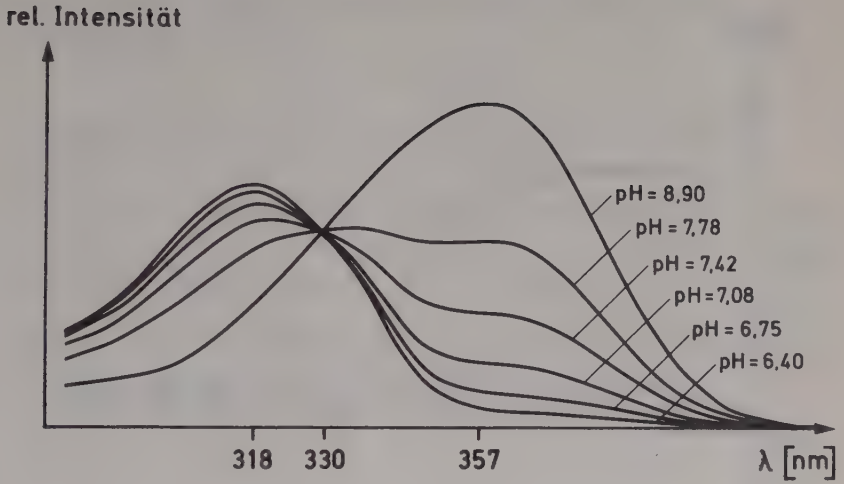


Abb.17 : Änderung der Anregungsspektren des
 β -Methylumbelliferon in Abhängigkeit
vom pH-Wert. ($\lambda_{em} = 445\text{nm}$)

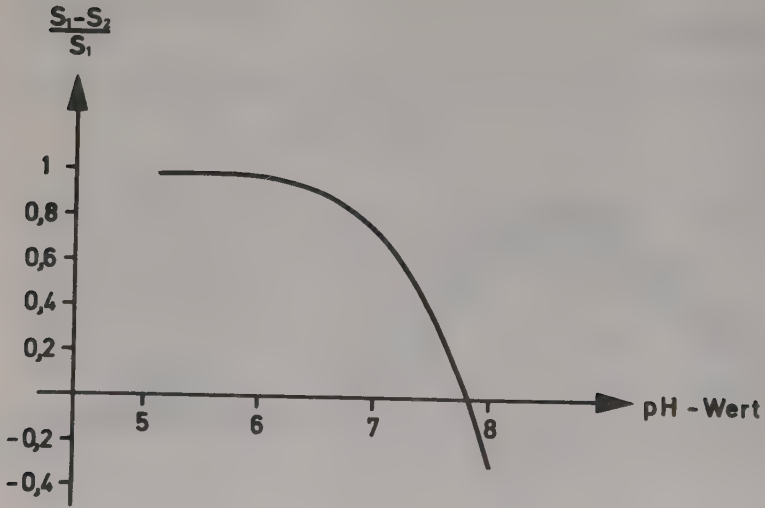


Abb.18 : Eichkurve der pH-Wertabhängigkeit der
Anregungsspektren des β -Methylumbelliferon.
(Darstellung über den Formfaktor als
Funktion des pH-Wertes.)

Die Abweichungen der nach dem Polynom 6. Grades berechneten Werte von den gemessenen Werten beträgt maximal $\pm 2/100$. Auch mit Bikarbonat- und Karbonatpuffer konnte die Eichkurve in Abb. 18 reproduziert werden. Die Abweichungen betrugen weniger als 1%. Damit dürfte eine Pufferabhängigkeit der Eichkurve auszuschließen sein.

Wie aus Abb. 17 hervorgeht, befindet sich bei der Wellenlänge $\lambda_{\text{isosb.}} = 330\text{nm}$ ein isosbestischer Punkt der Anregungsspektren. Dieser isosbestische Punkt legte die Vermutung nahe, daß das gelöste β -Methylumbelliferon als ein 2-Komponentensystem zu betrachten sei, wobei die eine Komponente das gelöste neutrale β -Methylumbelliferon darstellt, die andere den dissoziierten Indikator. Die beiden Komponenten können mit Hilfe der Strukturformel folgendermaßen dargestellt werden :



Mit einer Komponentenanalyse der Anregungsspektren versuchten wir, die Frage nach der Anzahl der Komponenten des Systems zu klären.

4.1.3 Komponentenanalyse der Anregungsspektren des β-Methylumbelliferon

Die Frage nach der Anzahl der Komponenten in den gepufferten, wässrigen β-Methylumbelliferon Lösungen, z.B. mehrere Dissoziationsstufen, undissoziiertes β-Methylumbelliferon und Assoziation, führte zur Adaption des KSPF an den Computer. Mit Hilfe der Mehrkomponentenanalyse nach WODICK und LÜBBERS (67, 68, 110, 116) sollte dabei entschieden werden, ob zwei oder mehrere Komponenten des Indikators in Lösung vorliegen.

Aufgabe des Rechners war es, ein simuliertes 2-Komponentensystem, bestehend aus den Komponenten der Anregungsspektren bei pH-Wert 5 und 8, mit den gemessenen Spektren zu vergleichen. Die Zwischenwertkurven wurden dabei durch prozentuale Änderungen der beiden Komponenten errechnet. Bei einer multiplikativen Farbstoffmischung gilt allgemein als Ansatz für ein n-Komponentensystem :

$$x_1 \cdot S_1(\lambda) + x_2 \cdot S_2(\lambda) + \dots + x_n \cdot S_n(\lambda) = \sum_{i=1}^n x_i \cdot S_i(\lambda) = S_{\text{gem}}(\lambda, \text{pH})$$

mit : $x_i = x_i(\text{pH})$ = prozentualer Anteil der Komponente $S_i(\lambda)$ bei einem bestimmten pH-Wert (4.1.3-1)

$S_{\text{gem}}(\lambda, \text{pH})$ = gemessenes Summenspektrum bei einem bestimmten pH-Wert

Das n-Komponentensystem kann auf drei Komponenten reduziert

werden, wenn wir uns die dritte Komponente aus beliebig vielen anderen Komponenten zusammengesetzt denken. Die dritte Komponente kann auch als Fehlerfunktion betrachtet werden. Aus Gl. (4.1.3-1) erhalten wir dann :

$$x_1 \cdot S_1(\lambda) + x_2 \cdot S_2(\lambda) + x_3' \cdot S_3'(\lambda) = S_{\text{gem}}(\lambda, \text{pH}) \quad (4.1.3-2)$$

$$\text{mit : } x_3' \cdot S_3'(\lambda) = \sum_{i=3}^n x_i \cdot S_i(\lambda)$$

In unserem System ist nun der Anfangs- und Endzustand bekannt, d.h. es liegen gemessene Spektren bei den pH-Werten 5 und 8 vor. Damit kennen wir die Größen :

$$x_1 \cdot S_1(\lambda) = S_{\text{gem}}(\lambda, \text{pH}=5) \quad \text{und} \quad x_2 \cdot S_2(\lambda) = S_{\text{gem}}(\lambda, \text{pH}=8)$$

Gilt in unserem gewählten Beispiel nun : $x_3' \cdot S_3'(\lambda) = 0$, dann liegt ein 2-Komponentensystem vor.

Abb. 19 zeigt die Anpassung einer berechneten Zwischenwertkurve an eine gemessene. Die Abweichungen der berechneten Zwischenwertkurve von der gemessenen liegen im Rahmen der Meßgenauigkeit des KSPF. Somit ist $S_3'(\lambda)$ nicht als weitere Summenkomponente, sondern als Fehlerfunktion zu verstehen. Unsere Vermutung, daß β -Methylumbelliferon in Lösung als 2-Komponentensystem vorliegt, ist damit bestätigt worden.

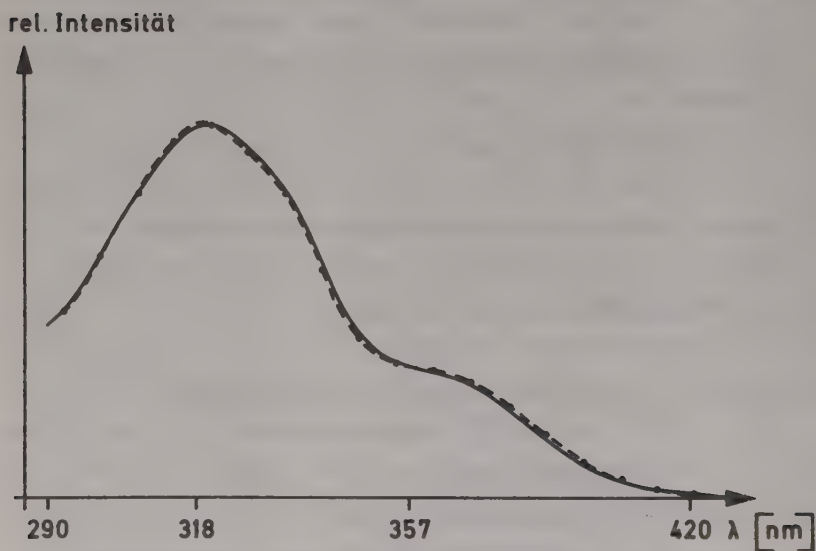


Abb.19 : Vergleich von gemessenem Spektrum
(durchgezogene Linie) und einem aus
zwei Komponenten berechneten Spektrum
(gestrichelte Linie).

4.1.4 Das Emissionsspektrum des β -Methylumbelliferon

Im Gegensatz zu den Anregungsspektren zeigen die Emissionsspektren keine Änderung des spektralen Verlaufs bei Variation des pH-Wertes. Ebenso konnte keine Konzentrationsabhängigkeit der Spektren festgestellt werden.

Abb. 20 zeigt das Emissionsspektrum des β -Methylumbelliferon bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{anr}} = 318\text{nm}$. Das Spektrum erstreckt sich über den Wellenlängenbereich von 400 - 580nm, mit einem Maximum bei 445nm, der charakteristischen Emissionswellenlänge. Wegen der Konzentrations- und pH-Wertabhängigkeit der Anregungsspektren ist die charakteristische Anregungswellenlänge nicht eindeutig definiert.

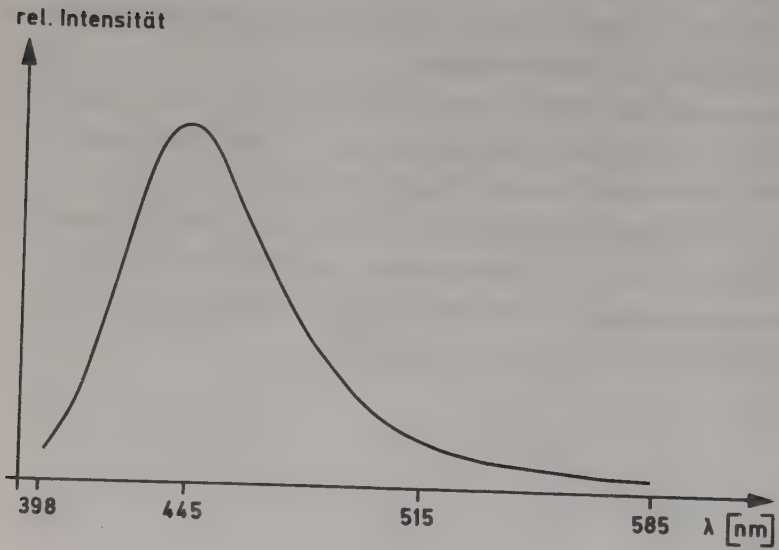
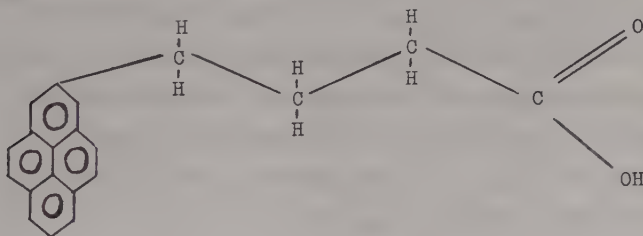


Abb.20 : Emissionsspektrum des β -Methylumbelliferon
($\lambda_{\text{anr}} = 318\text{nm}$)

4.2 Messungen mit Pyrenbuttersäure

Wie zu Beginn dieses Kapitels bereits erwähnt wurde, entdeckten VAUGHAN und WEBER⁽¹⁰⁹⁾ die Fluoreszenzlöschung der Pyrenbuttersäure durch Sauerstoff. KNOPP und LONGMUIR⁽⁵⁰⁾ wendeten diese Reaktion an, um intrazelluläre Sauerstoffkonzentrationen zu messen. Pyrenbuttersäure, $C_{16}H_9(CH_2)_3COOH$, mit der Strukturformel :



ist bei der EASTMAN KODAK Co., USA, kommerziell erwerbbar. Die Sauerstofflöschung der Fluoreszenz wurde von VAUGHAN und WEBER über die Messung der Lebensdauer des angeregten Zustands und der Fluoreszenzausbeute nachgewiesen.

Freie Pyrenbuttersäure hat eine Fluoreszenzlebensdauer von 100 nsec in mit Luft äquilibrierten Wasserlösungen und eine Lebensdauer von 135 nsec in desoxygenierten Wasserlösungen. Substanzen, die den angeregten Zustand stören können, haben so ein Vielfaches an Zeit, um zu den angeregten Molekülen diffundieren zu können, als sie es normalerweise bei Lebensdauern des angeregten Zustands in der Größenordnung von 10 bis 20 nsec haben würden. Das Volumen der Lösung, das den

angeregten Zustand eines Pyrenbuttersäuremoleküls beeinflussen kann, wird daher gegenüber dem Normalfall vergrößert.

Wir behandeln die Erscheinung der Fluoreszenzlöschung der Pyrenbuttersäure durch Sauerstoff erst in dem anwendungsbezogenen 5. Kapitel, da dann die meßtechnischen Voraussetzungen zur Variation des Sauerstoffgehalts der Lösung gegeben sind. Es soll aber schon an dieser Stelle erwähnt werden, daß, im Gegensatz zum β -Methylumbelliferon, die Spektren der Pyrenbuttersäure bei Variation des Sauerstoffgehalts den spektralen Verlauf nicht ändern, sondern lediglich die Intensität. Die Folge davon ist, daß die Spektren nicht durch einen Formfaktor erfaßt werden können.

Wegen der detaillierten Untersuchungsergebnisse der schon zitierten Autoren, konnten die Voruntersuchungen über den Indikator stark reduziert werden. Dazu kommt, daß Pyrenbuttersäure im Vergleich zum β -Methylumbelliferon ein relativ unkomplizierter Indikator ist. In den nachfolgenden Abschnitten beschränken wir uns daher darauf, die charakteristischen Daten der Spektren sowie die für die Anwendung der Fluoreszenzphotometrie wichtigen Ergebnisse über Löslichkeitsuntersuchungen in verschiedenen Lösungsmitteln mitzuteilen.

4.2.1 Das Anregungs- und Emissionsspektrum der Pyrenbuttersäure

In Abb. 21 ist das Anregungsspektrum einer Pyrenbuttersäure-

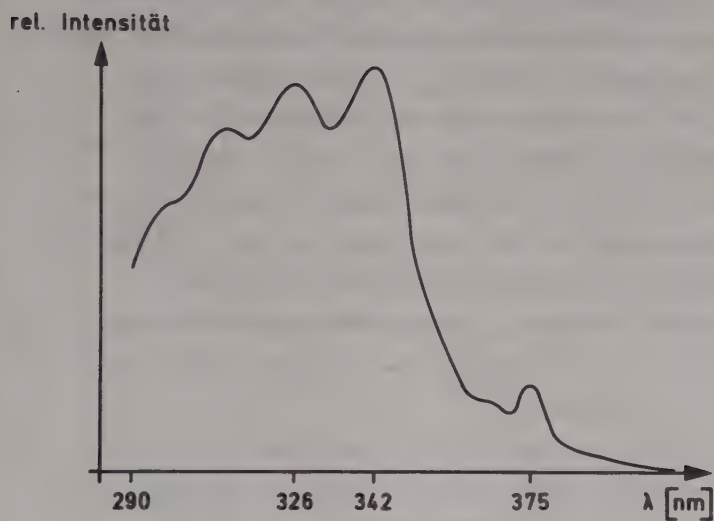


Abb.21 : Anregungsspektrum der Pyrenbuttersäure
($\lambda_{em} = 395nm$)

lösung dargestellt, das bei der charakteristischen Emissionswellenlänge $\lambda_{em} = 395\text{nm}$ aufgenommen wurde. Wie aus der Aufnahme hervorgeht liegen die charakteristischen Banden des Anregungsspektrums im selben Wellenlängenbereich wie die des β -Methylumbelliferon, nämlich zwischen 300 und 360nm. Abb.22 zeigt das Emissionsspektrum der Pyrenbuttersäure, das bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{anr} = 342\text{nm}$ aufgezeichnet wurde. Wie der Aufnahme zu entnehmen ist, liegen hier die Hauptbanden des Spektrums nicht im selben Wellenlängenbereich wie die des β -Methylumbelliferon (vergleiche Abb.20). Diese Tatsache wird für die Auswertung von Summenspektren mit den beiden Komponenten β -Methylumbelliferon und Pyrenbuttersäure Bedeutung erlangen. Näheres darüber wird im 5. Kapitel berichtet, wenn wir die simultane Messung des pO_2 und pCO_2 behandeln.

Eine sehr wichtige Frage der Fluoreszenzfotometrie mit Indikatoren ist die Frage der Löslichkeit, die wir im folgenden Abschnitt untersuchen werden.

4.2.2 Untersuchungen über die Löslichkeit der Pyrenbuttersäure in verschiedenen Lösungsmitteln.

Eine unerfreuliche Eigenschaft der Pyrenbuttersäure ist ihre geringe Löslichkeit in H_2O . So weist z.B. eine gesättigte, wässrige β -Methylumbelliferon Lösung eine um ca. einen Faktor 100 größere Fluoreszenzintensität auf als eine gesättigte, wässrige Pyrenbuttersäure Lösung. Da es für fluorometrische Untersuchungen, insbesondere aber für

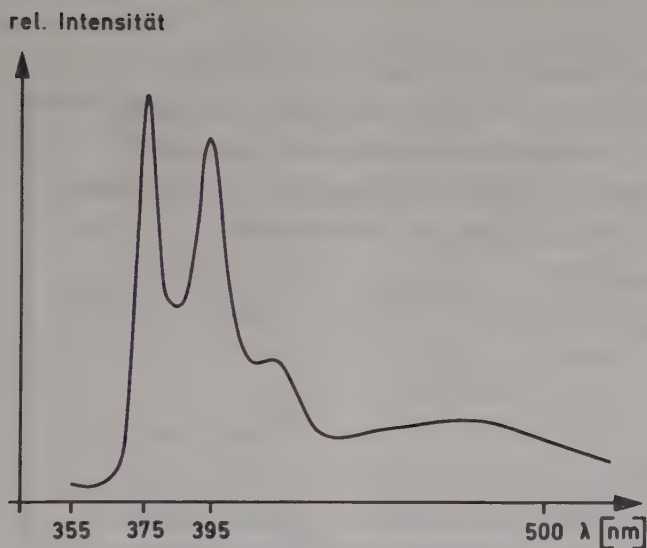
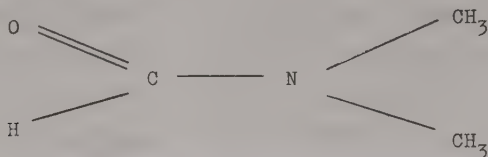


Abb.22 : Emissionsspektrum der Pyrenbuttersäure

($\lambda_{\text{anr}} = 342\text{nm}$)

quantitative Messungen, wichtig ist, intensive Fluoreszenzsignale zu erhalten, wurden Untersuchungen über die Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln angestellt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen seien hier kurz aufgezählt.

In Glycerin und Äthanol ist Pyrenbuttersäure ebenso wie in H_2O nur sehr gering löslich. In Aceton, aber mehr noch in Tween, einem Lösungsvermittler, wurde eine gegenüber H_2O erhöhte Löslichkeit festgestellt. Am wirkungsvollsten erwies sich jedoch als Lösungsmittel das Dimethylformamid, C_3H_7NO , mit der Strukturformel :



Mit Dimethylformamid können Konzentrationen in der Größenordnung von 0,5M erreicht werden, wobei die Löslichkeitsgrenze immer noch nicht erzielt ist. Bei derartig hohen Konzentrationen zeigt das Anregungsspektrum der Pyrenbuttersäure allerdings auch Konzentrationsabhängigkeit, wie aus der Abb. 23 hervorgeht. Da die Intensitätssteigerung der Fluoreszenz bei so hohen Konzentrationen der Indikatorlösung nur relativ gering ist, verwenden wir $10^{-2}M$ Lösungen der Pyrenbuttersäure in Dimethylformamid, die eine genügend hohe Fluoreszenzintensität erbringen.

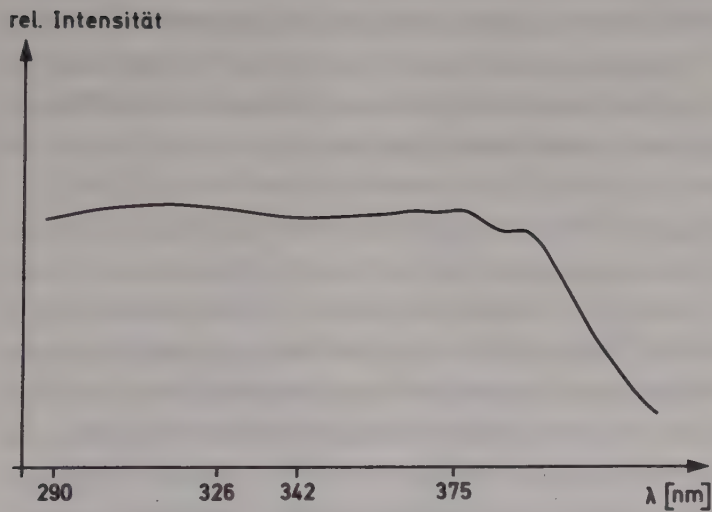


Abb.23 : Anregungsspektrum der Pyrenbuttersäure
gelöst in Dimethylformamid , $c = 0,5 \text{ M}$.
($\lambda_{\text{em}} = 395\text{nm}$)

5. Kapitel : Anwendung der quantitativen Fluoreszenz- fotometrie mit Indikatoren.

Die quantitative Fluoreszenzfotometrie mit Indikatoren wurde unter anderem mit der Zielvorstellung entwickelt, mit Hilfe des KSPF nach BOLDT⁽¹²⁾ und LÜBBERS eine optische Methode zur Blutgasanalyse zu erstellen. Die Begründung für eine derartige Entwicklung leitet sich aus dem gegenwärtigen Technologiestand der Blutgasanalyse mit Elektroden her. Sowohl die polarographische Methode als auch die Messung mit der Glaselektrode weisen gewisse Störanfälligkeiten auf, die vorab kurz aufgezeigt werden sollen.

Nach dem Prinzip der von STOW und RANDALL⁽¹⁰⁰⁾ sowie GERTZ und LOESCHCKE⁽³⁵⁾ entwickelten $p\text{CO}_2$ -Elektrode ruft der $p\text{CO}_2$ eine pH-Wertänderung in einer Testlösung hervor. Diese pH-Änderung wird mit einer Glaselektrode gemessen. Um schnelle Einstellzeiten bei $p\text{CO}_2$ -Änderungen zu erhalten, werden Testlösungen mit geringer Konzentration an NaHCO_3 verwendet. Wie ARNDT, BRINK, LÜBBERS und MAAS⁽⁵⁾ zeigen konnten, werden unter diesen Bedingungen die Messungen leicht durch Ionen verfälscht, die sich aus dem Glas der Glaselektrode lösen. Dazu kommt, daß in Salzlösungen störende Diffusionspotentiale an der Referenzelektrode entstehen. Störungen können auch auftreten, wenn ein Elektrodenbestandteil, z.B. die Stabilisierungsschicht, als Puffer wirkt. Da die Glaselektrode hochohmig ist, müssen ferner Isolation und Abschirmung ausreichend gut sein.

Ein prinzipieller Nachteil der polarographischen pO_2 -Messung⁽⁴⁴⁾ mit einer Platinelektrode⁽¹⁸⁾ ist der kontinuierliche Sauerstoffverbrauch, der das Meßergebnis beeinflusst.

Ein meßtechnischer Nachteil der Polarisationselektroden ist, daß sie bei pO_2 -Messungen katalytisch sauber sein müssen. Nur dann erhält man ein Plateau im Polarogramm und einen geringen Reststrom bei einem pO_2 von 0 Torr.

Darüberhinaus ist die Wartung beider Elektroden relativ schwierig und Konzentrationsverteilungen können nur punktweise, bzw. über ein Flächenareal gemittelt, erfaßt werden.

Die Entwicklung einer optischen Methode zur Blutgasanalyse, die für Routineuntersuchungen weniger störanfällig sein sollte, trifft nun auf verschiedene Schwierigkeiten. So wie die quantitative Absorptions- bzw. Reflexionsfotometrie erheblich erschwert wird durch Verzerrungen der Spektren im Gewebe gegenüber Küvettenpektren, bedingt durch Weißanteil, inhomogene Farbstoffverteilung und wellenlängenabhängige Lichtwege, so treten auch bei der Fluoreszenzfotometrie mit Indikatoren im Gewebe Verzerrungen der Spektren auf. Ursachen hierfür sind Konzentrationsänderungen des Indikators, Wechselwirkungen des Indikators mit anderen Substanzen, der Filtereffekt des Gewebes und Gewebeeigenfluoreszenz.

Der Fehler durch Konzentrationsänderungen kann eliminiert werden, wenn man spezielle Indikatoren verwendet, die ihre spektrale Verteilung in Abhängigkeit von der Reaktion ändern. Z.B. benutzten BOLDT⁽¹²⁾ und LÜBBERS den Indikator

β -Methylumbelliferon als pH-Indikator, der unterschiedliche Anregungsspektren für die dissoziierte und undissoziierte Form aufweist. Die anderen Fehler können nicht ohne besondere Messungen berücksichtigt werden.

Mit der Queranalyse bzw. der erweiterten Queranalyse nach WODICK und LÜBBERS⁽¹¹²⁾ ist ein Auswerteverfahren erstellt worden, das gegen Verzerrungen der erwähnten Art invariant ist.

Das durch das Gewebe verzerrte Indikatorspektrum kann mit dem wahren Spektrum in Verbindung gesetzt werden, wenn der Indikator im Gewebe in die dissoziierte bzw. undissoziierte Form überführt wird, was beispielsweise durch eine pH-Wert-änderung erfolgen kann. Setzt man die relativen Intensitäten des verzerrten und wahren Spektrums Wellenlänge für Wellenlänge in Beziehung, so erhält man eine Transformation, mittels der das wahre Indikatorspektrum aus dem Gewebespektrum gewonnen werden kann.

Unglücklicherweise ist dieses Auswerteverfahren ziemlich kompliziert und benötigt die Registrierung des gesamten Spektrums oder mindestens Messungen an zahlreichen Wellenlängen.

In einfacher Weise kann nun eine Unabhängigkeit von allen störenden Effekten im Gewebe erzielt werden, wenn man den Indikator vom Gewebe bzw. vom zu messenden Medium trennt. Dazu wurde eine Meßsonde konstruiert, die wir in Analogie zum Begriff Elektrode " Optode " nennen.

5.1 Die Optode (+)

5.1.1 Konstruktion der Optoden-Meßsonde

Mit der Optode ist es möglich, eine Fluoreszenzindikatorlösung mit dem zu messenden Medium in Verbindung zu bringen, z.B. zu begasen. Abb. 24 zeigt einen schematischen, nicht maßstäblichen Querschnitt der Optode. Sie besteht aus zwei Plexiglasteilen, zwischen denen eine Membran eingespannt wird. In die Frontplatte, die der Anregungsstrahlung ausgesetzt wird, ist ein Quarz-Suprasilglasfenster eingefügt. Zwischen Quarzfenster und Membran existiert ein zylinderförmiger Hohlraum von ca. 10 μ m Dicke und 18 mm Durchmesser für die Indikatorlösung. In das Anschlußstück sind zwei Stichbohrungen eingelassen, die der Zu- und Abführung des Gases dienen. Um den Pegel der Hintergrundstrahlung und Plexiglasfluoreszenz zu eliminieren, wurde der Begasungsraum als Lichtfalle schwarz ausgekleidet.

Die Optode wird anstelle der üblicherweise verwendeten Küvette im Spektrofluorometer angebracht. Die Eichung und experimentelle Erprobung erfolgte mit Eichgasgemischen bekannter Zusammensetzung.

5.1.2 Anforderungen an die verwendeten Membranen

Bevor mit den eigentlichen Messungen begonnen werden konnte, mußten umfangreiche Voruntersuchungen über die Membraneigen-

(+) "Vorrichtung zur Messung von Blutgasen", Patentanmeldung vom 28.2.1975, DPA-Nr. P 25 08 637.7

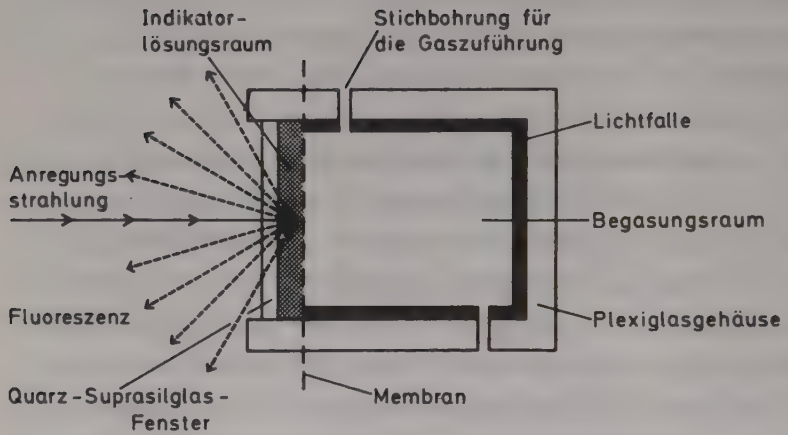


Abb.24 : Schematischer, nicht maßstäblicher
Querschnitt der Optode .

fluoreszenz, die Permeationsfähigkeit der zu messenden Stoffe durch die Membran und über die allgemeine optische Beschaffenheit der Membran durchgeführt werden.

Eine notwendige Voraussetzung für die Messung ist die Forderung nach hoher Semipermeabilität, d.h., die Membranen müssen eine genügend niedrige Selektivitätsgrenze besitzen, so daß das Indikatorlösungsmittel weder flüssig noch dampfförmig permeiert, die zu messenden biologischen Gase aber andererseits nicht durch zu hohe Diffusionswiderstände an der Permeation gehindert werden. Die Selektivitätsgrenze bedeutet hier die Grenzgröße der molaren Masse, von der ab größere Moleküle die Membran nicht mehr passieren können⁽⁸²⁾. Die Gasdurchlässigkeit der Membran kann durch folgende Beziehung definiert werden :

$$d = \frac{q}{p \cdot t \cdot f} \quad (5.1.2-1)$$

q ist hierbei die Gasmenge, die in der Zeit t die Membranfläche f beim Überdruck p passiert. Vergleicht man verschiedene Membrantypen hinsichtlich der Gasdurchlässigkeit, so ist in obiger Beziehung impliziert, daß von gleicher Membrandicke ausgegangen werden muß.

Statt Löslichkeitsmembranen erscheint es sinnvoller Porenmembranen zu nehmen, da Löslichkeitsmembranen im Lösungsmittel quellen und als Folge davon auf der Begasungsseite das Lösungsmittel abdampfen, was die Semipermeabilität verschlechtert. Porenmembranen stellen dagegen Molekularsiebe dar, die die

Lösung entweder an der Oberfläche oder über ein System von Poren im Innern der Membran, Tiefenfiltern gleich, festhalten. Neben Poren der Nenngröße, meistens ausgedrückt über die Selektivitätsgrenze, besitzen Porenmembranen auch eine abfallende Zahl von größeren und kleineren Poren⁽²⁵⁾. Die statistische Verteilung der Porengröße wird bei Stoffen, deren molare Masse sich nur wenig unterscheidet, immer die Semipermeabilität verschlechtern. Man kann daher mit SCHULZ⁽⁹³⁾ annehmen, daß für eine gegebene Membran überhaupt keine scharfe Trenngrenze bei einem bestimmten Molekulargewicht existiert.

Somit ist zu erwarten, daß über kurz oder lang - je nach Membrantyp - Indikatorlösungsmittel und insbesondere Lösungsmitteldampf aus der Indikatorlösung entweichen, wodurch sich die Konzentrationsverhältnisse im Indikatorlösungsraum ändern.

Darüberhinaus können durch Gasblasenbildung im Indikatorraum die optischen Verhältnisse so beeinträchtigt werden, daß keine vernünftige Auswertung der Spektren mehr möglich ist. Diesen Fehlern kann aber durch relativ schnelle Messungen und Begasung mit Lösungsmitteldampf gesättigtem Gas entgegengewirkt werden.

Für spektrofluorometrische Untersuchungen ist es weiterhin wünschenswert, daß die Membran eine regelmäßige Struktur aufweist und auch die Dicke der Membran über der Bestrahlungsfläche optisch einheitlich ist. Wie die späteren Messungen

zeigten wirken sich strukturelle Veränderungen wie Knicke und feine Haarrisse entscheidend auf das Fluoreszenzspektrum aus. Die dadurch bedingten spektralen Veränderungen sind bei Wiederverwendung der Membran nur schwer zu reproduzieren.

Zusätzlich zu diesen Kriterien ist eine weitere Forderung an die Membranen zu stellen. Die Membranen dürfen nur geringe Eigenfluoreszenz und einen geringen Reflexionsgrad für das Streulicht der Anregungsstrahlung aufweisen. Besonders bei relativ schwachen Fluoreszenzintensitäten, bedingt durch z.B. geringe Schichtdicke der Optode, um schnelle Einstellzeiten zu erhalten, kann das Signal-Störsignalverhältnis von Indikator- zu Membranfluoreszenz sehr ungünstig werden. Es empfiehlt sich daher, entweder die Membraneigenfluoreszenz zu unterdrücken oder das eigentliche Meßsignal so zu verstärken, daß das Störsignal vernachlässigbar wird.

Untersuchungen an mit Silber, Kupfer und Platin besputterten Teflonmembranen ließen eine deutliche Unterdrückung der Eigenfluoreszenz erkennen. Andererseits stieg aber der Pegel der reflektierten Streulichtstrahlung an und die Einstellzeiten der Messungen wurden verzögert.

Zur Eliminierung der Streulichtstrahlung sind geschwärzte Membranen geeignet, jedoch wird auch bei dieser Modifikation die Einstellzeit der Messung erhöht. Um schnelle Einstellzeiten zu erhalten erscheint es daher sinnvoll, das Fluoreszenzsignal durch Konzentrationserhöhung der Indikatorlösung zu vergrößern, um einen besseren Signal-Störsignalabstand zu erhalten.

Wegen der geringen Löslichkeit der Fluoreszenzindikatoren in Wasser wurden daher, wie im 4. Kapitel beschrieben, verschiedene Lösungsmittel getestet. Dimethylformamid wurde als geeignetes Lösungsmittel mit relativ hoher Löslichkeit für die Indikatoren gefunden.

Ist die Membraneigenfluoreszenz nicht zu vernachlässigen, überlagert sich also additiv dem eigentlichen Meßsignal, dann muß dies bei der Auswertung der Spektren berücksichtigt werden. Das geschieht in einfacher Weise so, daß man die mit bidestilliertem Wasser gefüllte Optode zusammen mit der jeweiligen Membran spektral vermißt und diese Grundlinie als neue Nullage wertet.

5.1.3 Die Einstellzeit der Optode

Die Einstellzeit des Meßendwertes der Optode hängt von verschiedenen Faktoren ab :

- a) von dem Diffusionswiderstand der Membran (Porengröße und Membrandicke)
- b) von der chemischen bzw. physikalischen Reaktion des Gases mit dem Fluoreszenzindikator
- c) bei pH-Wert abhängigen Reaktionen von der Pufferkapazität des Lösungsmittels
- d) bei Säure-Base Indikatoren von der Konzentration des Indikators
- e) von der Schichtdicke der Indikatorlösung .

Da es vom physiologischen Standpunkt wünschenswert ist, schnelle Einstellzeiten der Optode zu erzielen, wurde unter Berücksichtigung der Stabilität und Genauigkeit des Meßwertes eine Optimierung der angeführten Punkte vorgenommen.

Die Beeinflussung der Einstellzeit durch die Schichtdicke der Indikatorlösung ist erheblich. Es ist daher sinnvoll, mit der Schichtdicke so weit herunterzugehen, wie noch vernünftige Fluoreszenzsignale erzielt werden können. Bei relativ hohen Konzentrationen der Indikatorlösung ist es möglich, die Schichtdicke auf wenige μm zu verringern, allerdings wird bei Säure-Base Indikatoren die Einstellzeit dann durch die erhöhte Indikatorkonzentration verzögert, da der Fluoreszenzindikator selbst als Puffer wirkt.

Bei pH-Wert abhängigen, chemischen Reaktionen wird die Einstellzeit ferner besonders durch die Pufferkapazität des Lösungsmittels bestimmt. Die Pufferung ist andererseits für die Stabilität des pH-Wertes von Bedeutung. Wie die Messungen ergaben konnte jedoch mit 10^{-3}M NaHCO_3 -Lösungen ein guter Kompromiss zwischen diesen gegensätzlichen Forderungen erzielt werden.

Unter Berücksichtigung der im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Anforderungen an die Membranen, erwiesen sich Teflonmembranen für Messungen mit der Optode am geeignetsten. Vorwiegend haben wir $6\mu\text{m}$ -Teflonmembranen verwendet, da diese Membranstärke auch hinreichende mechanische Stabilität aufweist.

Zudem hatten Messungen mit $2\mu\text{m}$ -Teflonmembranen gegenüber $6\mu\text{m}$ -Membranen keine Verkürzung der Einstellzeit erbracht. Bei $12\mu\text{m}$ -Teflonmembranen stieg die Einstellzeit gegenüber der $6\mu\text{m}$ -Membran jedoch auf etwa das doppelte an.

Die chemische bzw. physikalische Reaktion des zu messenden Gases mit dem Fluoreszenzindikator bildet die theoretisch untere Grenze der erzielbaren Einstellzeit. Diese Reaktionszeit liegt im Falle der pCO_2 -Messung in der Größenordnung einiger hundertstel Sekunden, bei der pO_2 -Messung im Bereich weniger Nanosekunden. Bei chemischen Reaktionen kann darüber hinaus mit Hilfe von Katalysatoren eine Reaktionsbeschleunigung vorgenommen werden. Auf diesen Punkt wird bei der Vorstellung der pCO_2 -Optode noch näher eingegangen.

Ein Vergleich der verschiedenen, die Einstellzeit bestimmenden Faktoren zeigt, daß die Einstellzeit der Optode im Wesentlichen durch den Diffusionsprozess des Gases durch die Membran und die Indikatorlösungsschicht bestimmt ist. Theoretisch dürfte man daher einen exponentiellen Verlauf der Einstellkurve erwarten, der auch empirisch gefunden wurde.

Die Kinetik der Äquilibrierung ist damit ein wichtiges Hilfsmittel zur Beurteilung einer fehlerfreien Messung. Abweichungen vom exponentiellen Verlauf der Einstellkurve und Drift des Meßwertes im Gleichgewicht weisen so z.B. auf Undichtigkeiten der Optoden-Meßsonde hin.

5.1.4 Säubern,Füllen,Dichten und Zusammenbau der Optode

Die in ihre Bestandteile zerlegte Optode wird mit Alkohol gereinigt und anschließend mit bidestilliertem Wasser mehrfach gespült.Nach dem Trocknen der einzelnen Teile kann die Füllung vorgenommen werden.Dazu wird auf die Innenseite des Quarzfensters der Optoden-Frontplatte ein Tropfen Indikatorlösung aufgebracht,der mit einem saugfähigen Papiertuch auf etwa Streichholzkopfgröße wieder abgesaugt wird.Der verbleibende Tropfen wird mit einer Membran überzogen,die die Grundfläche der Plexiglasplatte abdeckt. Teflonmembranen wirken so neben ihrer eigentlichen Membranfunktion auch als Dichtungsmaterial der Optode.Auf die Membran wird dann ein feines,durchsichtiges Papiertuch gelegt,das über der Membranfläche glatt gestrichen wird, so daß sich die Indikatorlösung gleichmäßig über der Quarzfensterfläche verteilt.Während dieses Vorgangs ist darauf zu achten,daß sich über der Bestrahlungsfläche keine Luftbläschen festsetzen.Danach wird das Papiertuch wieder entfernt.Die Membran haftet jetzt selbständig an der Plexiglas- und Quarzfläche.Die Schichtdicke des Indikatorfilms beträgt nach diesem Vorgang weniger als $10\mu\text{m}$.

Zur weiteren Abdichtung des Indikatorraums benutzen wir Dichtungsfett,das auf die Kontaktfläche des Optoden-Anschlußstücks aufgetragen wird und zwar bis zu einem Dichtungsring (O-Ring,Durchmesser 25mm),der den Indikatorlösungsraum einschließt.Testmessungen zeigten,daß die Dichtung der Optode

durch den O-Ring und die Teflonmembran in den überwiegenden Fällen hinreichend war, so daß auf Verwendung des Dichtungsfetts meistens verzichtet werden konnte.

Die beiden Kontaktflächen der Plexiglasteile wurden danach aufeinandergelegt und mit acht kreisförmig angeordneten Schrauben verschraubt. Bei zusätzlicher Dichtung mit Fett wird dabei das Dichtungsfett bis an den Dichtungsring angepreßt, ohne daß es in den Meßgutraum eindringen kann.

Eine so vorbereitete Optode kann daraufhin zur Messung eingesetzt werden.

5.2 Die pCO₂-Optode

Für die pCO₂-Optode⁽⁸¹⁾ verwendeten wir den Fluoreszenzindikator 8-Methylumbelliferon, gesättigt gelöst in 10⁻³M NaHCO₃, der die spektrale Verteilung der korrigierten Anregungsspektren in Abhängigkeit vom pH-Wert ändert (Abb.17). Für die Auswertung der Spektren in einer Eichkurve wählten wir im Gegensatz zu Gl.(4.1.1-1) den Formfaktor :

$$F'(pCO_2) = \frac{S_2(\lambda_2)}{S_1(\lambda_1)} \quad , \quad (5.2-1)$$

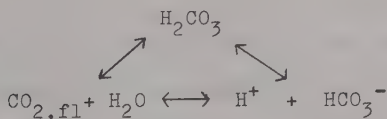
da dieser Formfaktor, wie im Abschnitt 5.2.2 beschrieben wird, bei logarithmischer Auftragung gegen den pCO₂ eine Linearisierung der Eichkurve ermöglicht. Der Formfaktor wurde wieder an den Wellenlängen λ_1 und λ_2 gebildet, zwischen denen die Änderung der korrespondierenden Signale S_1 und S_2 maximal ist.

Auch bei diesem Modus der Auftragung sind die korrigierten Anregungsspektren gegen Änderungen der apparativen Verstärkung invariant.

5.2.1 Funktionsprinzip der $p\text{CO}_2$ -Optode

Analog zur $p\text{CO}_2$ -Elektrode nach STOW und RANDALL⁽¹⁰⁰⁾, GERTZ und LOESCHKE⁽³⁵⁾ und anderen^(34,43,96,97) findet im Indikatorlösungsraum der Optode die Hydratation des physikalisch gelösten CO_2 -Gases statt. Durch die nachfolgende Dissoziation der Kohlensäure wird der pH-Wert der Indikatorlösung geändert und damit die Form der Anregungsspektren. Anhand einer Eichkurve läßt sich somit der $p\text{CO}_2$ über die pH-Wertabhängigkeit der Anregungsspektren bestimmen. Abb. 25 zeigt die Abhängigkeit der Anregungsspektren des β -Methylumbelliferon vom prozentualen CO_2 -Angebot.

Die Hydratation des CO_2 verläuft nach den Untersuchungen von EIGEN, KUSTIN und MAAS⁽²⁶⁾ wahrscheinlich nach dem Reaktionsschema :



Nach den heutigen Kenntnissen ist anzunehmen, daß die Protonenabspaltung eher erfolgt als die Bildung von H_2CO_3 . Da es für Gleichgewichtsstudien keinen Unterschied macht, welchen Weg

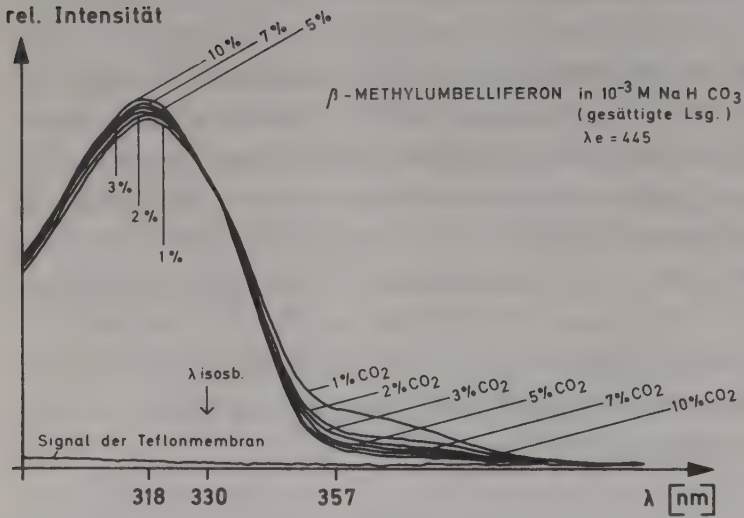


Abb.25 : Abhängigkeit der Anregungsspektren des
 β -Methylumbelliferon vom prozentualen
CO₂-Angebot.

die Reaktion nimmt, wird das Gleichgewicht zweckmäßigerweise folgendermaßen formuliert :

$$\frac{[\text{H}^+] \cdot [\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2]_{\text{fl}} \cdot [\text{H}_2\text{O}]} = K_1 \quad (5.2.1-1)$$

wobei $[\]$ die Konzentration bedeutet und K_1 die Gleichgewichtskonstante des Massenwirkungsgesetzes.

Unter Berücksichtigung der Aktivitäten läßt sich das Gleichgewicht auch wie folgt angeben :

$$\frac{a_{\text{H}} \cdot f_{\text{HCO}_3^-} [\text{HCO}_3^-]}{f_{\text{CO}_2} [\text{CO}_2] \cdot a_{\text{H}_2\text{O}}} = K_1 \quad (5.2.1-2)$$

Logarithmiert man das Massenwirkungsgesetz, so folgt daraus die HENDERSON-HASSELBALCH'sche Gleichung⁽⁷⁶⁾:

$$\text{pH} = \text{p}K_1 + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{\alpha \cdot \text{pCO}_2} \quad (5.2.1-3)$$

mit : $\alpha \cdot \text{pCO}_2 = [\text{CO}_2]_{\text{fl}}$ und α = Löslichkeitskoeffizient.

Berücksichtigt man noch die Dissoziation von Wasser und die zweite Dissoziationsstufe von H_2CO_3 , so gilt statt der

HENDERSON-HASSELBALCH'schen Gleichung folgende Beziehung,

in der die Elektroneutralitätsbedingung : $[\text{Na}^+] = [\text{HCO}_3^-] + 2 \cdot [\text{CO}_3^{2-}]$

berücksichtigt wurde :

$$\alpha \cdot p\text{CO}_2 = \frac{[\text{Na}^+] \cdot [\text{H}^+] + [\text{H}^+]^2 - K_w}{K_1 + \frac{2 \cdot K_1 \cdot K_2}{[\text{H}^+]}} \quad (5.2.1-4)$$

K_w ist hier das Ionenprodukt des Wassers und K_2 die Gleichgewichtskonstante der zweiten Dissoziationsstufe.

Löst man Gl.(5.2.1-4) nach der Wasserstoffionenkonzentration auf, so erhält man eine kubische Gleichung :

$$\begin{aligned} [\text{H}^+]^3 + [\text{H}^+]^2 \cdot [\text{Na}^+] - K_1 \cdot [\text{H}^+] \cdot \alpha \cdot p\text{CO}_2 - [\text{H}^+] \cdot K_w - \\ - 2 \cdot K_1 \cdot K_2 \cdot \alpha \cdot p\text{CO}_2 = 0 \end{aligned} \quad (5.2.1-5)$$

Diese Gleichung zeigt, daß bei einer beliebigen Variation der Wasserstoffionenkonzentration keine lineare Beziehung zwischen pH und $\log p\text{CO}_2$ besteht.

Um dennoch eine lineare Eichkurve der $p\text{CO}_2$ -Optode zu erhalten, haben wir verschiedene Formfaktoren getestet, wobei der Formfaktor S_2/S_1 unseren Anforderungen weitestgehend entsprach, wie im nächsten Abschnitt beschrieben wird.

Die Eichung der $p\text{CO}_2$ -Optode erfolgte mit wasserdampfgesättigten CO_2 - N_2 -Gasgemischen, um das Verdampfen des Indikatorlösungsmittels zu verhindern. Mit Hilfe einer Gasmischpumpe (Wösthoff, Bochum) konnte dabei die prozentuale Zusammensetzung des Gasgemisches variiert werden. Die Umrechnung von $\% \text{CO}_2$ in $p\text{CO}_2$ wurde mit Hilfe der Gleichung⁽⁸⁰⁾:

$$\frac{\%CO_2}{100} \cdot (B - p_{H_2O}) = pCO_2 \quad (5.2.1-6)$$

vorgenommen. B ist dabei der Barometerdruck und p_{H_2O} der Wasserdampfdruck, der einer Tabelle aus der Literatur⁽⁸⁰⁾ entnommen wurde.

5.2.2 Eichkurve der pCO_2 -Optode und weitere Meßergebnisse

Trägt man in einer Eichkurve den Formfaktor F' gegen den pCO_2 in kartesischen Koordinaten auf, so erhält man eine Kurve mit hyperbolischem Verlauf (Abb.26). Daher wird folgender Ansatz zur mathematischen Beschreibung der Eichkurve gewählt :

$$F'(pCO_2) = A \cdot (pCO_2 - D)^n \quad (5.2.2-1)$$

mit : $n < 1$ und $A, D = \text{konst.}$

Wenn die Eichkurve in Abb.26 durch diesen Ansatz richtig beschrieben wird, muß die logarithmische Auftragung des Formfaktors F' gegen den pCO_2 einen linearen Verlauf ergeben. Wie aus der Abb.27 hervorgeht, findet man bei logarithmischer Auftragung des Wertes $(pCO_2 - 1)$ gegen den Formfaktor F' im Bereich 1 bis 70 Torr eine gute Linearität der pCO_2 -Optode. Für $D = 1$ ergibt sich also eine gute Anpassung des mathematischen Ansatzes an die Meßkurve.

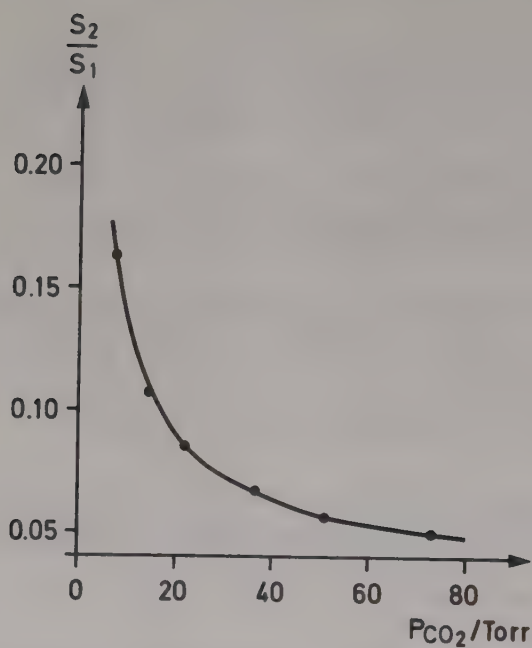


Abb.26 : Eichkurve der pCO_2 -Optode in
kartesischen Koordinaten.

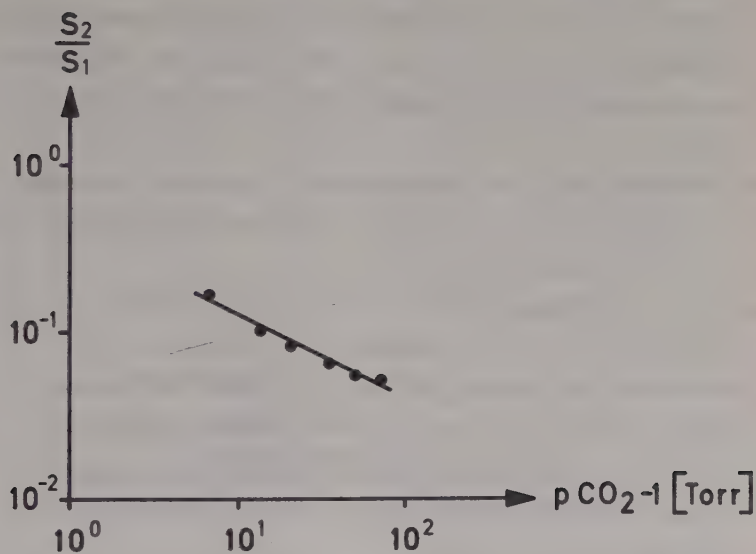


Abb.27 : Eichkurve der $p\text{CO}_2$ -Optode
(Logarithmische Darstellung)

Verwendet man eine Teflon $6\mu\text{m}$ -Membran, dann beträgt die Einstellzeit der pCO_2 -Optode 3 - 4sec, bezogen auf 90% des Endwertes, gegenüber der üblicherweise verwendeten pCO_2 -Elektrode mit 30 - 60sec⁽⁵⁾. Durch Zugabe des Enzyms Carboanhydrase ließ sich eine Einstellzeit der pCO_2 -Optode erzielen, die etwa bei 1sec lag, wieder bezogen auf 90% (Abb.28). Carboanhydrase ist ein Katalysator der Hydratation des CO_2 -Gases.

Der mittlere Fehler des Einzelwertes δ , also die Standardabweichung, wurde aus 10 Aufnahmen bei einem pCO_2 von 36,5 Torr zu $\delta = \pm 2\%$ bestimmt.

Bei pCO_2 -Werten, die größer als 70 Torr sind, nimmt die Empfindlichkeit der Meßanordnung ab, da die pH-Werte im Grenzbereich des Indikators liegen. Hier müßte ein anderer Indikator oder eine Indikatormischung verwendet werden. Als Beispiel eines solchen Indikators kann das Dichlorfluorescein angeführt werden, dessen Umschlagspunkt im pH-Wertbereich 4 bis 6 liegt.

5.3 Die pO_2 -Optode

5.3.1 Funktionsprinzip der pO_2 -Optode

Für die pO_2 -Optode⁽⁶⁶⁾ verwendeten wir eine 10^{-2}M Lösung des Indikators Pyrenbuttersäure in Dimethylformamid, dessen Fluoreszenz bei Begasung mit Sauerstoff gelöscht wird^(50,109) (Abb.29), wobei der pO_2 direkt aus der relativen Änderung der Spektren mittels einer Eichkurve bestimmt werden kann.

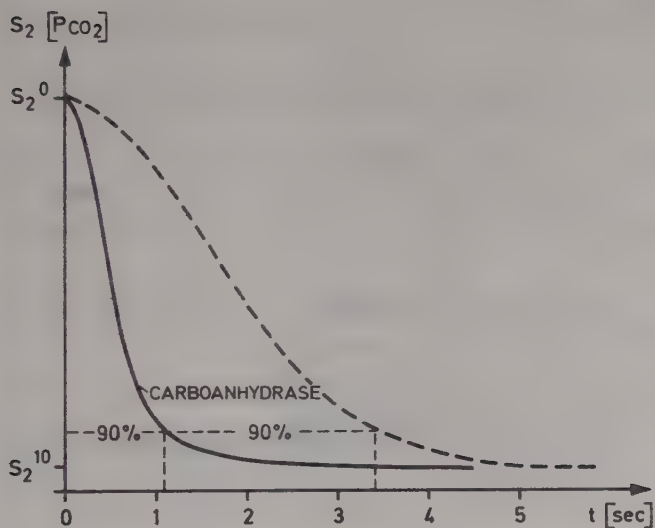


Abb.28 : Einstellzeit der $p\text{CO}_2$ -Optode bei einem $p\text{CO}_2$ -Sprung von 0 auf 10 $\% \text{CO}_2$.(Zeitliche Auftragung des Signals S_2 während der Äquilibrier.)

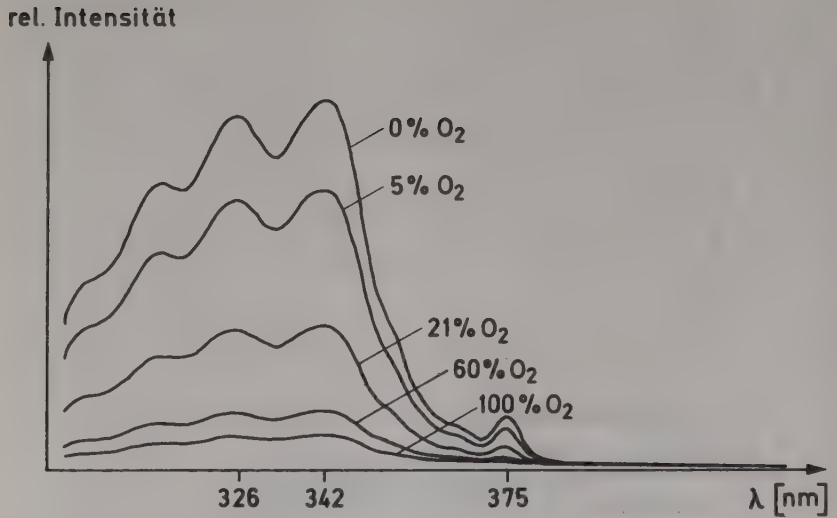


Abb.29 : Fluoreszenzlöschung der Anregungsspektren
der Pyrenbuttersäure durch Sauerstoff.
(10^{-2} M in Dimethylformamid), $\lambda_{em} = 395\text{nm}$

Abb.29 zeigt die Fluoreszenzlöschung der korrigierten Anregungsspektren der Pyrenbuttersäure in Abhängigkeit vom prozentualen Sauerstoffangebot bei einer Emissionswellenlänge von $\lambda_{em} = 395\text{nm}$ und konstanter apparativer Verstärkung. Da die Spektren bei Variation des pO_2 sich nur durch einen konstanten Faktor z unterscheiden und nicht, wie z.B. das β -Methylumbelliferon, ihre spektrale Verteilung ändern, erfolgt die Auswertung an einer Wellenlänge $\lambda' = 342\text{nm}$, bei der die Änderung des korrespondierenden Signals S' maximal ist.

5.3.2 Eichkurve der pO_2 -Optode und weitere Meßresultate

Trägt man bei der pO_2 -Messung in einer Eichkurve die reziproke Fluoreszenzintensität S' gegen den pO_2 auf (Abb.30), mit S'_0 = Fluoreszenzintensität bei einem pO_2 von 0 Torr, so zeigt die pO_2 -Optode im Bereich 0 bis 300 Torr gute Linearität. D.h., die Fluoreszenzlöschung von Pyrenbuttersäure durch Sauerstoff kann in diesem Bereich durch die STERN-VOLMER-Löschgleichung⁽⁹⁹⁾ beschrieben werden :

$$S'_0 = S' \cdot (1 + k \cdot pO_2) \quad (5.3.2-1)$$

mit : k = Löschkonstante .

Messungen mit $6\mu\text{m}$ -Teflonmembranen ergaben Einstellzeiten von 2 - 3sec (90%). Im Gegensatz zu pO_2 -Elektroden^(18,36,37) werden die pO_2 -Endwerte nicht durch Sauerstoffeigenverbrauch verfälscht.

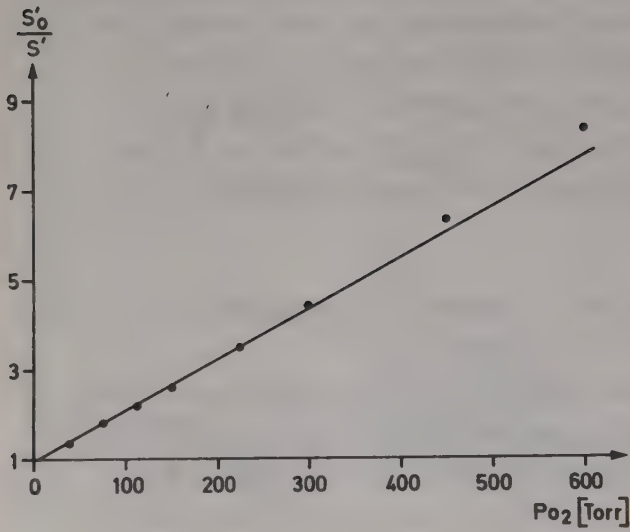


Abb.30 : Eichkurve der pO_2 -Optode
(reziproke Auftragung des Fluoreszenzsignals S' gegen den pO_2)

Die Standardabweichung bei einem pO_2 von 155 Torr wurde aus 10 Messungen zu $\bar{\epsilon} = \pm 1,3\%$ bestimmt.

Abb.31 zeigt den zeitlichen Verlauf des Fluoreszenzsignals S' während der Äquilibrierung bei einem pO_2 -Sprung von 0 auf 155 Torr.

5.3.3 Theorie der Fluoreszenzlöschung

Für pO_2 -Werte größer als 300 Torr wächst in der pO_2 -Eichkurve (Abb.30) die Löschwirkung stärker als proportional an, was durch das Auftreten eines zweiten Löschmechanismus erklärt werden kann⁽³¹⁾.

Die Theorie der Fluoreszenzlöschung unterscheidet zwei Mechanismen, den der statischen und den der dynamischen Löschung. Die statische Löschung wird durch Komplexbildung der fluoreszierenden mit den löschenden Molekülen verursacht, die dynamische durch Desaktivierung der angeregten Fluorochrome aufgrund von Kollisionen mit den Löschmolekülen, wobei die Anregungsenergie übertragen wird.

Die mathematische Beschreibung dieser Prozesse führt zu einer quadratischen Abhängigkeit der Löschwirkung von der Konzentration der Löschsubstanz, wenn beide Mechanismen gleich stark in Erscheinung treten, ihre Löschkonstanten k und k' also identisch sind.

Unterscheiden sich die Löschkonstanten, so wird man in jedem Fall einen stärker als proportionalen Anstieg der pO_2 -Eichkurve erwarten. Damit sind die Meßergebnisse in guter Übereinstimmung mit der Theorie.

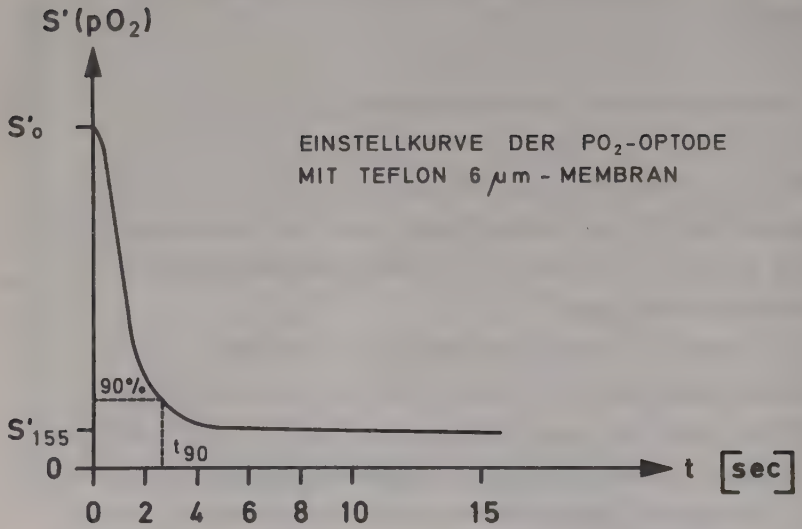


Abb.31 : Einstellkurve der pO_2 -Optode bei
einem pO_2 -Sprung von 0 auf 155 Torr.

Aufgrund der Viskositäts- und Temperaturabhängigkeit der Löschwirkung konnten VAUGHAN und WEBER⁽¹⁰⁹⁾ nachweisen, daß für niedrige und mittlere pO_2 -Werte die dynamische Löschung, also die Kollisionslöschung, vorliegt. Erst mit wachsender Konzentration tritt die statische Löschung in Erscheinung.

5.4 Die kombinierte pO_2 - pCO_2 -Optode zur simultanen Messung des pO_2 und pCO_2 .

Für die simultane Messung des pO_2 und pCO_2 ⁽⁸³⁾ bieten sich theoretisch drei Kombinationsmöglichkeiten der Einzeloptoden an :

- 1) Lösungsmischungen aus beiden Indikatoren
- 2) " Parallelschaltung " der Einzeloptoden (nebeneinander) und
- 3) " Serienschaltung " der Einzeloptoden (hintereinander).

Anhand von Voruntersuchungen konnten wir die für die simultane Messung geeignetste Anordnung bestimmen.

5.4.1 Voruntersuchungen zur simultanen pO_2 - pCO_2 -Messung

Die erste Kombinationsmöglichkeit der Einzeloptoden weist den Nachteil auf, daß bei Lösungsmischungen beider Indikatoren das Lösungsmittel notwendigerweise immer eine wässrige Komponente enthalten muß, um überhaupt die Hydratation des physikalisch gelösten CO_2 -Gases zu ermöglichen.

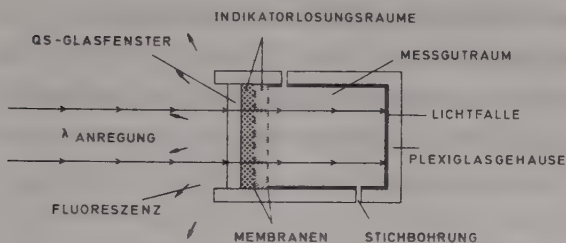
Dann aber zeigt der O_2 -Indikator Pyrenbuttersäure auch

CO_2 -Empfindlichkeit, d.h., die Fluoreszenz wird auch durch CO_2 gelöscht, wodurch das Auswerteverfahren komplizierter und die Bestimmung beider Meßgrößen ungenauer wird. Prinzipiell lassen sich aber auch in diesem Fall der pO_2 und pCO_2 bestimmen. Benötigt werden dazu drei Eichkurven, die die pCO_2 -Abhängigkeit der β -Methylumbelliferon-Fluoreszenz und die Fluoreszenzlöschung der Pyrenbuttersäure durch CO_2 bzw. O_2 widerspiegeln.

Genauere Meßwertbestimmungen ermöglichen die Anordnungen "Serien-" und "Parallelschaltung", da in beiden Fällen die Lösung der Pyrenbuttersäure in Dimethylformamid durch eine Membran oder einen Steg von der wässrigen Phase getrennt ist. Wegen dieser Gemeinsamkeit sollen beide Anordnungen verglichen werden (Abb. 32).

Der Vergleich beider Anordnungen zeigt, daß hinsichtlich schneller Einstellzeiten der Äquilibrierung die Parallelschaltung vorteilhafter sein dürfte. Im Hinblick auf Miniaturisierung der kombinierten Optode dürfte dagegen die Serienschaltung den Vorzug erhalten. Nachteilig bei der Serienschaltung ist, daß die 1. Optode für die Anregungsstrahlung und die Fluoreszenz der 2. Optode ein Filter darstellt. Durch geeignete Wahl der Indikatorkonzentration in der 1. Optode kann diesem Filtereffekt aber entgegengewirkt werden. Außerdem kann man den Indikator mit relativ geringer Löslichkeit vorne, den mit höherer Löslichkeit dahinter anordnen.

1) KOMBINIERTE OPTODE IN SERIENSCHALTUNG
(MULTIPLIKATIVE FARBSTOFFMISCHUNG)



2) KOMBINIERTE OPTODE IN PARALLELSCHALTUNG
(ADDITIVE FARBSTOFFMISCHUNG)

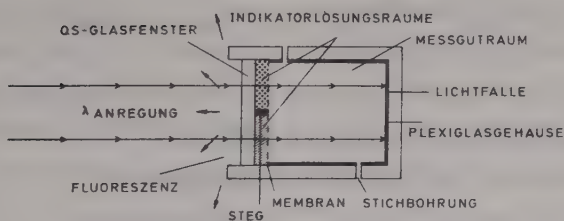


Abb.32 : Schematische Darstellung der kombinierten pO_2 - pCO_2 -Optode in Serien- bzw. Parallelschaltung zur simultanen pO_2 - pCO_2 -Messung.

Die nachfolgend dargestellten Spektren und Eichkurven wurden sämtlich mit der in Serienschaltung konstruierten, kombinierten Optode aufgenommen. Wie die Voruntersuchungen ergaben, läßt sich das Summenspektrum der multiplikativen Farbstoffmischung additiv aus den Einzelspektren der Indikatoren bestimmen.

Meßtechnisch besteht nun die Möglichkeit, die Summenspektren entweder in Anregung oder in Emission aufzunehmen. Für das Summenspektrum in Anregung gilt :

$$S_{\Sigma}^{\text{Anr}} = g_1(\lambda_{\text{Em}}) \cdot c_1 \cdot S_{\text{B-M}}^{\text{Anr}}(\lambda, p\text{CO}_2) + g_2(\lambda_{\text{Em}}) \cdot c_2 \cdot S_{\text{PBA}}^{\text{Anr}}(\lambda) \cdot k(p\text{O}_2)$$

und in Emission : (5.4.1-1)

$$S_{\Sigma}^{\text{Em}} = g_1(\lambda_{\text{Anr}}) \cdot c_1 \cdot S_{\text{B-M}}^{\text{Em}}(\lambda) \cdot k'(p\text{CO}_2) + g_2(\lambda_{\text{Anr}}) \cdot c_2 \cdot S_{\text{PBA}}^{\text{Em}}(\lambda) \cdot k(p\text{O}_2)$$

Hierbei sind : (5.4.1-2)

g_1, g_2 = Gewichtsfunktionen in Abhängigkeit von
der Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge

c_1, c_2 = Konzentrationen der beiden Indikatorkomponenten

$S_{\text{B-M}}, S_{\text{PBA}}$ = Spektralverteilungen der Komponenten in
Anregung bzw. Emission

$k(p\text{O}_2)$ = Löschfaktor der Sauerstofflöschung

$k'(p\text{CO}_2)$ = Scheinlöschfaktor, der im folgenden noch näher
definiert wird.

Es lassen sich zwei grundsätzliche Unterschiede zwischen
Anregungs- und Emissionsmessung feststellen :

- 1) Die spektrale Verteilung der Emissionsspektren des β -Methylumbelliferon ist invariant gegen pCO_2 - und pH-Wert - Änderungen. Durch geeignete Anregung der basischen Komponente des Indikators kann jedoch ein Löscheffekt simuliert werden, der dadurch bedingt ist, daß sich die optimale (charakteristische) Anregungswellenlänge in Abhängigkeit vom pH-Wert bzw. pCO_2 verschiebt. Als Folge davon kann bei Emissionsmessungen ein Faktor $k'(pCO_2)$ von der spektralen Verteilungsfunktion abgespalten werden, den wir als Scheinlöschfaktor bezeichnen.
- 2) Im Gegensatz zu den Anregungsspektren liegen die Emissionshauptbanden der beiden Indikatorkomponenten nicht im selben Wellenlängenbereich.

Diese letztere Tatsache hat bezüglich Empfindlichkeit und Genauigkeit in der Meßwertbestimmung erhebliche Bedeutung für das Auswerteverfahren. Dazu sei als erstes die Auswertung in Anregung betrachtet.

5.4.2 Auswerteverfahren der Summenspektren in Anregung (3A - Verfahren)

Wie schon erwähnt erlauben es die Verhältnisse in Anregung nicht, irgendeine Komponente des Summenspektrums an irgendeiner Wellenlänge zu vernachlässigen, da beide Spektren im selben Wellenlängenbereich liegen. Mit Hilfe der Mehrkomponentenanalyse nach WODICK und LÜBBERS^(68,110) könnte dieses Problem dennoch ganz allgemein (für beliebige Komponenten) gelöst werden.

In dem vorliegenden Spezialfall der Indikatoren Pyrenbuttersäure und β -Methylumbelliferon existiert darüberhinaus ein Auswerteverfahren, das mit relativ geringem Aufwand angewendet werden kann.

Grundlage dieser Auswertung ist der isosbestische Punkt der β -Methylumbelliferon Spektren. Wegen der Formänderung der spektralen Verteilung in Abhängigkeit vom pH-Wert kann durch geeignete Formfaktorbildung der additive Signalanteil der Pyrenbuttersäure Komponente am Summenspektrum eliminiert werden.

Ein solcher Formfaktor ist z.B. $F = S_2 - S_1 / S_3 - S_1$, wobei die Signale S_1 , S_2 und S_3 zu Wellenlängen gehören, bei denen die Signale der Pyrenbuttersäure Komponente gleich groß sind. Dieser Formfaktor ist damit invariant gegen pO_2 -Änderungen des Summenspektrums und hängt nur von der durch CO_2 verursachten Änderung ab. Die pO_2 -Bestimmung kann an der isosbestischen Wellenlänge des β -Methylumbelliferon Spektrums erfolgen, da das Summenspektrum an dieser Wellenlänge gegen CO_2 -Änderungen invariant ist.

Ein Ziel fotometrischer Meß- und Auswerteverfahren ist, die Zahl der benötigten Wellenlängen zu beschränken. Im vorliegenden Fall können wir die zur Auswertung benötigten Wellenlängen auf drei reduzieren, wenn eine der drei Wellenlängen des Formfaktors mit der isosbestischen Wellenlänge der β -Methylumbelliferon Spektren identisch ist. Damit bestimmt die isosbestische Wellenlänge die zum Formfaktor korrespondierenden Wellenlängen.

Der Vorgang sei anhand der Abb.33 erläutert :

In das Anregungsspektrum der Pyrenbuttersäure wird die isosbestische Wellenlänge der β -Methylumbelliferon Spektren eingetragen. Korrespondierende Wellenlängen sind nun die, deren zugehörige Signale gleich große Intensitäten aufweisen. In dem dargestellten Fall gelingt es, zu $\lambda_{\text{isosb.}}$ noch drei weitere Wellenlängen zu finden. Eine allgemeinere Betrachtung führt sofort zu der notwendigen Schlußfolgerung, daß in dem Spektrum mindestens zwei relative Extremwerte existieren müssen, um überhaupt drei identische Signale zu erhalten. Darüberhinaus ist eine weitere Bedingung zu erfüllen, die für eine Auswertung nach dem geschilderten Verfahren dann hinreichend ist. Die isosbestische Wellenlänge muß an solchen Stellen des Spektrums liegen, für die mindestens zwei korrespondierende Wellenlängen existieren. Diese Bereiche wurden in der Abbildung durch Pfeile gekennzeichnet.

Im Falle der Pyrenbuttersäure und des β -Methylumbelliferon sind beide Kriterien erfüllt. Von den drei korrespondierenden Wellenlängen wählt man unter dem Gesichtspunkt hoher Genauigkeit nun zwei Wellenlängen aus. In unserem Beispiel sind das die Wellenlängen λ_1 und λ_2 . λ_3 wurde nicht gewählt, da diese Wellenlänge an der steilen Flanke des β -Methylumbelliferon Spektrums liegt. Durch mangelnde Reproduzierbarkeit der Wellenlänge λ_3 würde daher ein besonders großer Fehler bei der Bestimmung der relativen Intensitäten entstehen.

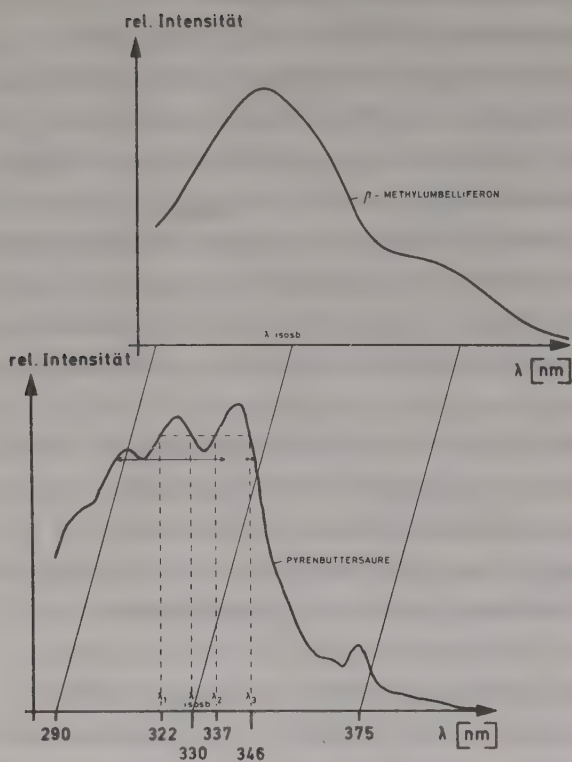


Abb.33 : Bestimmung der zu λ_{isob} . korrespondierenden Wellenlängen λ_1 , λ_2 und λ_3 .

Die für das Auswerteverfahren in Anregung erforderlichen Bedingungen bedeuten bezüglich der Genauigkeit und Empfindlichkeit eine erhebliche Einschränkung in der Meßwertbestimmung. Daher sollen einige Worte der Kritik angeführt werden. Das Auswerteverfahren in Anregung basiert auf einer hohen Reproduzierbarkeit der zur Messung verwandten Wellenlängen, da mangelnde Reproduzierbarkeit einen relativ großen Fehler in der Intensitätsbestimmung zur Folge hat.

Betrachtet man außerdem das Spektrum des β -Methylumbelliferon an den Wellenlängen λ_1 und λ_2 , so erkennt man, daß an diesen Stellen nur geringe $p\text{CO}_2$ -Empfindlichkeit herrscht. Diese ungünstigen Voraussetzungen veranlaßten uns daher, die Auswertung in Emission vorzunehmen.

5.4.3 Auswertung der Summenspektren in Emission

Im Gegensatz zu den Anregungsspektren liegen die Hauptbanden der Emissionsspektren von Pyrenbuttersäure und β -Methylumbelliferon nicht im selben Wellenlängenbereich. Dieser Sachverhalt erlaubt eine Auswertung an Wellenlängen maximaler O_2 - und CO_2 -Empfindlichkeit des Summenspektrums.

Die Hauptbanden des Emissionsspektrums von gealterter Pyrenbuttersäure, d.h. von einer Lösung des Indikators, bei der infolge Bestrahlung die langwellige Komponente des Emissionsspektrums ausgebleicht ist, liegen im Bereich 360 bis 420 nm, die des β -Methylumbelliferon im Bereich 420 bis 490 nm. Beide Spektren (Abb. 20 und Abb. 22) überschneiden sich nur

geringfügig, so daß Änderungen der einen Komponente bei der Bestimmung der anderen vernachlässigbar sind. Hinzu kommt, daß durch geeignete Wahl der charakteristischen Emissions- und Anregungswellenlänge eine Komponente hervorgehoben, die andere unterdrückt wird. Die charakteristischen Wellenlängen für die pO_2 -Bestimmung sind (Abb.34) :

$$\lambda_{\text{anr}}^{\text{PBA}} = 342\text{nm} \quad ; \quad \lambda_{\text{em}}^{\text{PBA}} = 375\text{nm} \quad (\text{Wellenlänge der Auswertung})$$

und für die pCO_2 -Bestimmung :

$$\lambda_{\text{anr}}^{\beta\text{-M}} = 370\text{nm} \quad ; \quad \lambda_{\text{em}}^{\beta\text{-M}} = 445\text{nm} \quad (\text{Wellenlänge der Auswertung})$$

Eine Eigentümlichkeit bei den Emissionsspektren des β -Methylumbelliferon ist, daß im Gegensatz zu den Anregungsspektren bei Begasung mit CO_2 keine Formänderung der spektralen Verteilung auftritt, sondern lediglich eine Scheinlöschung der Fluoreszenzintensität (Abb.35). Diese scheinbare Löschwirkung durch CO_2 wird bei fester Anregungswellenlänge dadurch hervorgerufen, daß sich das Anregungsspektrum zu Gunsten der dissoziierten β -Methylumbelliferon Komponente verschiebt, also bei verschiedenen CO_2 -Werten verschiedene optimale Anregungswellenlängen existieren. Als Folge davon wird nun die CO_2 -Bestimmung auch nur an einer Wellenlänge vorgenommen. Wie aus Abb.35 hervorgeht, wurde für die pCO_2 -Bestimmung bei der Emissionsmessung eine höhere Empfindlichkeit gefunden als bei der Anregungsmessung. Der pCO_2 kann jetzt bis ca. 110 Torr mit guter Genauigkeit bestimmt werden.

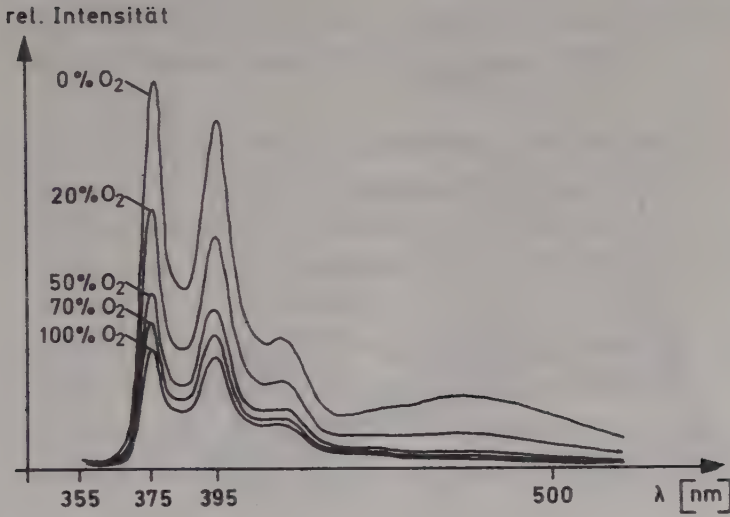


Abb.34 : O₂-Löschung der Pyrenbuttersäurefluoreszenz
des Summenspektrums in Emission (kombinierte
Optode). $\lambda_{\text{anr}}^{\text{PBA}} = 342\text{nm}$; $\lambda_{\text{em}}^{\text{PBA}} = 375\text{nm}$ (Auswert.)

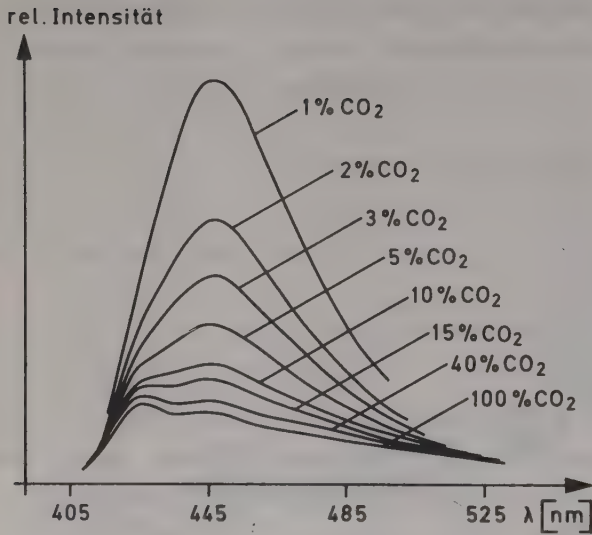


Abb.35 : CO₂-Scheinlöschung der β -Methylumbelliferon-Fluoreszenz des Summenspektrums in Emission (kombinierte Optode). $\lambda_{\text{anr}}^{\beta\text{-M}} = 370\text{nm}$;
 $\lambda_{\text{em}}^{\beta\text{-M}} = 445\text{nm}$ (Auswertung)

5.4.4 Eichkurven der kombinierten pO_2 - pCO_2 -Optode und weitere Meßergebnisse .

Die in den nachfolgenden Abbildungen dargestellten Eichkurven wurden mit kombinierten Optoden in Serienschaltung erstellt. Verwendet wurden für die Optoden :

- a) $10^{-2}M$ Lösungen von Pyrenbuttersäure in Dimethylformamid,
- b) gesättigte Lösungen von β -Methylumbelliferon in Lösungsmittelmischungen aus H_2O und Dimethylformamid (Mischungsverhältnis 10:1).

Bei der Herstellung der wässrigen β -Methylumbelliferon - Dimethylformamid Lösungsmischung kann nicht willkürlich verfahren werden. Vorrangig ist zu beachten, daß das geeignete Verhältnis H_2O : Dimethylformamid getroffen wird, damit :

- 1) die Konzentration an β -Methylumbelliferon in der Lösung hinreichend hoch ist, so daß die Eigenfluoreszenz der Membran vernachlässigbar wird,
- 2) die Indikatorkonzentration eine obere Grenze jedoch nicht überschreitet, da β -Methylumbelliferon selbst als Puffer wirkt und zu hohe Konzentrationen die Einstellzeit verlängern,
- 3) die alkalische Komponente im Anregungsspektrum des Indikators erscheint, so daß eine gute CO_2 -Empfindlichkeit existiert.

Zu der 3.Forderung ist zu erwähnen,daß β -Methylumbelliferon gelöst in reinem Dimethylformamid ein Anregungsspektrum ergibt,bei dem nur die saure Komponente erscheint,also keine CO_2 -Empfindlichkeit mehr besteht.Verdünt man die Lösung mit Wasser,so fällt ein Teil des gelösten β -Methylumbelliferon wieder aus und die basische Komponente steigt an.Als bestes Mischungsverhältnis hat sich daher die unter b) angeführte Lösungsmittelmischung erwiesen.

Trägt man bei der simultanen pO_2 - pCO_2 -Messung in einer pCO_2 -Eichkurve die Differenz der Signaländerung : $\Delta S_x = S_x - S_{100}$ logarithmisch gegen den pCO_2 auf,wobei die Werte auf die Gesamtänderung : $\Delta S_{\text{ges}} = S_1 - S_{100}$ zwischen 1% CO_2 und 100% CO_2 bezogen werden,so erhält man im Bereich 10 bis 110 Torr eine gute Linearität der kombinierten Optode (Abb.36).. Ebenso wurde für die pO_2 -Messung im Bereich 0 bis 400 Torr eine lineare Eichkurve gefunden,wenn man die reziproke Fluoreszenzintensität S' gegen den pO_2 aufträgt,wobei S_0' wieder die Fluoreszenzintensität bei einem pO_2 von 0 Torr ist (Abb.37) .

Die Einstellzeiten bezogen auf 90% des Endwertes lagen bei Verwendung von $6\mu\text{m}$ -Teflonmembranen für die pO_2 -Messung um etwa 6sec,für die pCO_2 -Messung bei 8-10sec.

Bei Verwendung von Carboanhydrase erzielten wir eine Einstellzeit der pCO_2 -Messung von 2,5sec,wieder bezogen auf 90% des Endwertes.Im Vergleich zu den Messungen mit Einzeloptoden konnten bei der Messung mit der kombinierten Optode keine

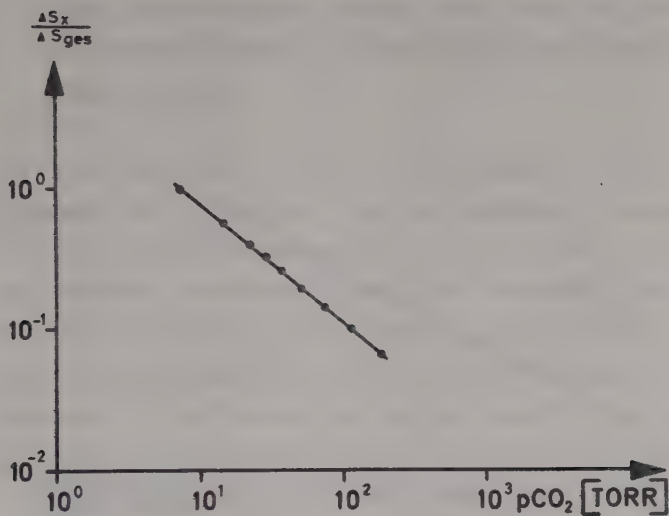


Abb. 36 : pCO_2 -Eichkurve der kombinierten Optode
zur simultanen pO_2 - pCO_2 -Messung

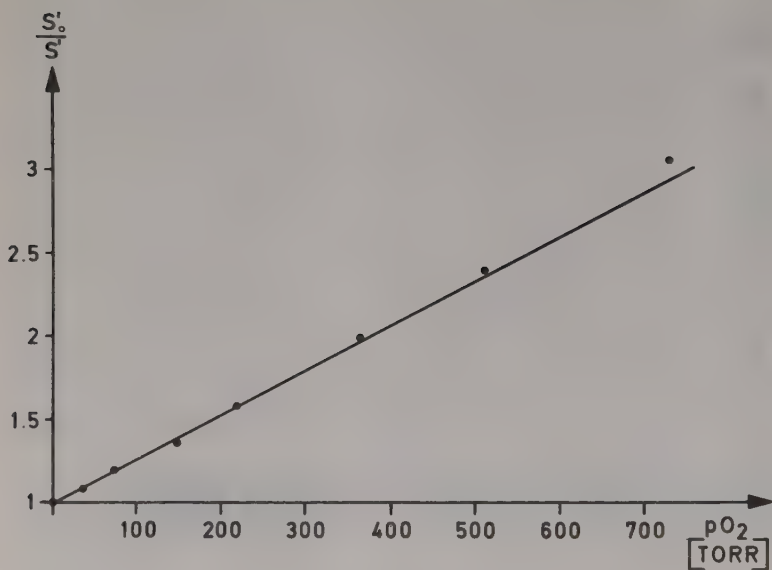


Abb.37 : pO_2 -Eichkurve der kombinierten Optode
zur simultanen pO_2 - pCO_2 -Messung

Einbußen hinsichtlich Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Meßwerte festgestellt werden.

5.5 Erste biomedizinische Anwendung der Optode zur Messung des oberflächlichen pO_2 am schlagenden Meerschweinchenherzen in situ.

Wir haben das Ziel, mit Hilfe der pO_2 -Optode den pO_2 an der Oberfläche des schlagenden Meerschweinchenherzens zu messen. Für diese Untersuchungen steht das KSPF nach BOLDT und LÜBBERS zur Verfügung. Da wir mit diesem Gerät den Meßort nicht an das biologische Objekt verlegen können, sind wir darauf angewiesen, das Herz aus dem Torax des Meerschweinchens zu operieren. (+) Das isolierte Meerschweinchenherz wurde nach der Operation mit einer Blutersatzlösung (Ringerlösung) perfundiert, wobei die Möglichkeit bestand, mittels Doppelperfusion auf eine Gaskonzentration der Perfusionslösung von 95% O_2 und 5% CO_2 bzw. 95% N_2 und 5% CO_2 zu schalten.

Zur Messung am Meerschweinchenherzen mußte die Optode in der Weise modifiziert werden, daß die Möglichkeit bestand, das Herz luftdicht an die Membran der Optode anzukoppeln. Dazu wurde statt des üblicherweise verwendeten Anschlußstücks der Optode, das den Meßgutraum einschließt, eine 1mm starke, geschwärzte Metallplatte verwendet, die mit der Optoden-Frontplatte zusammengeschraubt werden konnte.

(+) Die operativen Eingriffe wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Th. Barankay ausgeführt.

In der Mitte wies die Metallplatte eine kreisförmige Lochblende von $\varnothing = 6\text{ mm}$ auf, über die das Meerschweinchenherz an die Optoden-Membran angeschlossen werden konnte. Die luftdichte Ankopplung des Herzens an die Optode wurde mit dem Bioklebstoff Histoacryl vorgenommen. Eine schematische, nicht maßstäbliche Darstellung der Optode zur Messung des oberflächlichen pO_2 am Meerschweinchenherzen zeigt die Abb. 38. Die Untersuchungen wurden an drei verschiedenen Meerschweinchenherzen ausgeführt, wobei die Messungen sich jeweils über 3h erstreckten. Auch nach dieser Meßzeit schlugen die isoliert perfundierten Herzen intakt weiter.

Abb. 39 zeigt anhand der Spektralverteilungen die beiden verschiedenen pO_2 -Meßwerte an der Herzoberfläche, wobei das Perfusat einmal mit 95% N_2 und 5% CO_2 , das andere Mal mit 95% O_2 und 5% CO_2 äquilibriert war.

Beiden Spektren ist die Herzschlagfrequenz überlagert, da durch die Pulsation des Herzens die Indikatorschichtdicke der Optode geringfügig verändert wurde. Festzustellen ist, daß bei Sauerstoffperfusion eine höhere Herzfrequenz vorliegt als bei Stickstoffperfusion. Um einen gänzlichen Herzstillstand zu vermeiden, wurde daher die Stickstoffperfusion nicht länger als 5 Minuten durchgeführt.

Legt man für die quantitative Auswertung der Spektren bei dem mit 95% N_2 und 5% CO_2 äquilibrierten Perfusat einen pO_2 von 0 Torr auf der Herzoberfläche zugrunde, so wird der pO_2 bei der mit 95% O_2 und 5% CO_2 äquilibrierten Blutersatz-

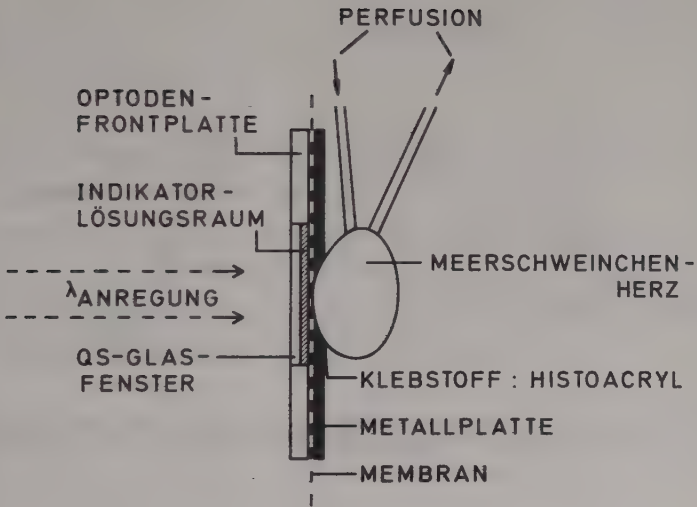


Abb.38 : Schematische, nicht maßstäbliche Darstellung der Optode zur Messung des oberflächlichen pO_2 am Meerschweinchenherzen.

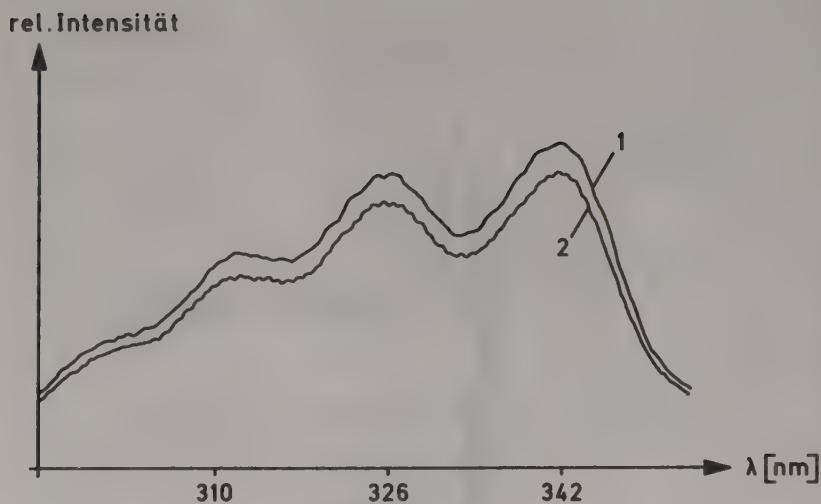


Abb. 39 : Die beiden verschiedenen oberflächlichen pO_2 -Werte am Meerschweinchenherzen anhand der Sauerstofflöschung der Pyrenbuttersäurefluoreszenz aufgrund entsprechend äquilibrierter Perfusionslösungen.

lösung anhand einer pO_2 -Eichkurve des Indikators zu 65 ± 5 Torr bestimmt. Bei Perfusionsstop und nachfolgender Sauerstoffperfusion erhielten wir einen pO_2 von 75 Torr. Damit sind Perfusionsstop und Stickstoffperfusion hinsichtlich des oberflächlichen pO_2 am Meerschweinchenherzen annähernd vergleichbar.

Abb.40 zeigt die zeitliche Auftragung der Signaländerung ($\lambda = 342\text{nm}$) bei Umschaltung auf die verschiedenen äquilibrierten Perfusate. Der Aufnahme ist zu entnehmen, daß die Einstellzeit bis 90% des Endwertes ca. 2,5min beträgt. Im vorliegenden Fall könnte die Einstellzeit durch einen erhöhten Perfusionsfluß verkürzt werden.

Anhand dieses Anwendungsbeispiels konnte damit gezeigt werden, daß sich das Optoden-Meßprinzip auch für Messungen an biologischen Objekten eignet.

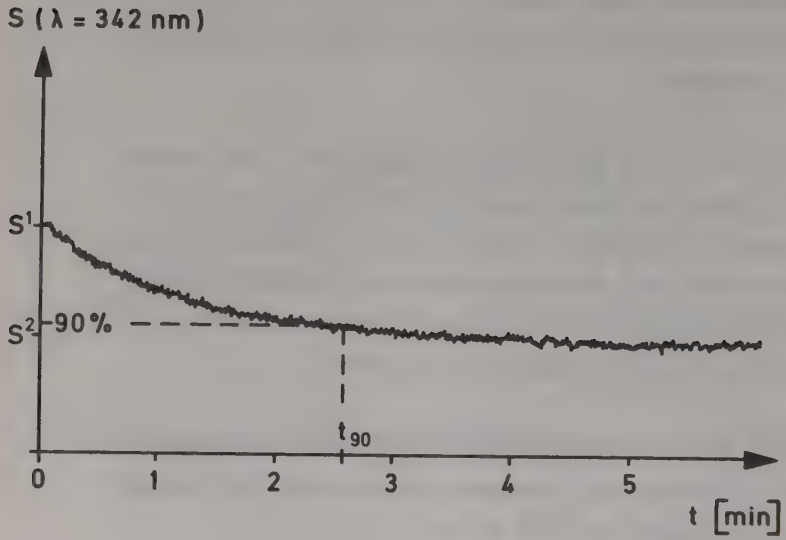


Abb.40 : Zeitliche Auftragung der Signaländerung
bei Umschaltung auf die verschieden
äquilibrierten Perfusate.

6. Kapitel : Mikro- bzw. nanoverkapselte Fluoreszenzindikatormoleküle als Meßsonden auf der Basis des Optoden-Meßprinzips in bis zu submikroskopische Bereiche.

Das anhand der makroskopischen Optode im 5. Kapitel vorgestellte Optoden-Meßprinzip weist unter anderem den Vorteil auf, daß es auch bis in submikroskopische Größenbereiche verwendet werden kann. Wenn es gelingt, eine Anzahl der jeweiligen Fluoreszenzindikatormoleküle in mikroskopisch kleine Kapseln einzuschließen, wobei die Kapselmembran für den zu messenden Stoff und für das benötigte Licht durchlässig sein muß, dann erhält man Optoden im Mikromaßstab.

Die Technologie für die Mikro- bzw. Nanoverkapselung ist bereits so weit entwickelt, daß die Verkapselung von Fluoreszenzindikatoren auf keine unüberwindlichen Schwierigkeiten traf.⁽⁺⁾ Die beiden Verfahren der Mikro- bzw. Nanoverkapselung werden im Abschnitt 6.1 dieses Kapitels näher beschrieben.

Neben dem Vorteil, daß mit diesen Mikro- bzw. Nanosonden physiologische Parameter in biologischen Strukturen der Größenordnung μm (z.B. Kapillaren) gemessen werden können, ermöglicht gerade die Technologie der Verkapselung eine effizientere Steuerung der Selektivität dieser Kapselmembranen gegenüber den üblicherweise gefertigten makroskopischen Membranflächen.

(+) Die Herstellung der Kapseln wurde freundlicherweise von Herrn H.J. Bisson in der Galenischen Abteilung (Leiter : Herr Prof. Dr. P.P. Speiser) des Pharmazeutischen Instituts der ETH-Zürich (Schweiz) vorgenommen.

Als Folge davon ergab sich die Möglichkeit, das Optoden-Meßprinzip auch auf Ionenmessungen zu erweitern, wie am Beispiel der H^+ -Ionenmessung im Abschnitt 6.2 dargelegt wird.

6.1 Verfahren zur Verkapselung von Fluoreszenzindikatoren

6.1.1 Die Mikroverkapselung

Der Begriff Mikroverkapselung⁽⁷³⁾ umschreibt einen Vorgang, der es gestattet, feste oder flüssige Teilchen von ca. 1 - 1000 μm mit einer festen Hülle zu verkapseln. Die vorliegende Methode der Mikroverkapselung beschränkt sich auf das Koazervationsverfahren, das auch unter dem Namen NCR-Verfahren bekannt ist, da die "National Cash Register Company" diese Technologie am weitesten entwickelt hat. Der Vorgang der Koazervation wird hervorgerufen, wenn die Löslichkeit eines oder mehrerer makromolekularer Stoffe im Lösungsmittel durch geeignete Maßnahmen herabgesetzt wird, z.B. durch pH-Änderung, Zugabe eines "Nicht-Lösungsmittels", Temperaturänderung oder andere geeignete Schritte.

Schon von BUNGENBERG de JONG⁽¹⁵⁾ beobachtet, aber noch nicht zur Verkapselungstechnik ausgenützt, wurde die Eigenschaft mancher Koazervate, Glas, organische, nicht mit Wasser mischbare Flüssigkeiten und Kohlepartikel so gut zu benetzen, daß diese Partikel von der Koazervatphase völlig umhüllt wurden. Erklärt wurde dieses Verhalten damit, daß die Grenz-

flächenspannung zwischen Einschluß und Koazervat sehr gering ist und so die gute Benetzbarkeit ermöglicht. Dies kann als eine der Voraussetzungen für die Verkapselung mit Koazervaten angesehen werden.

Bei der Mikroverkapselung durch Koazervierung können im Wesentlichen 5 Prozessschritte unterschieden werden. Bei der Vielzahl der verwendeten Hüllmaterialien sind aber Abweichungen von der Regel nicht außergewöhnlich. Die beschriebene Folge der Prozessschritte entspricht daher dem Normalverfahren.

- 1) Die zu umhüllende Substanz wird in der Dispersionsflüssigkeit, die in der Regel das Wandmaterial gelöst enthält, als Suspension oder Emulsion verteilt.
- 2) Das gelöste Wandmaterial wird durch geeignete Maßnahmen als Koazervat in flüssiger Form abgeschieden.
- 3) Das konzentrierte flüssige Wandmaterial umschließt die zu umhüllenden Teilchen.
- 4) Das flüssige Wandmaterial wird durch geeignete Maßnahmen verfestigt. Die Kapseln sollten danach als einzelne Einheiten vorliegen.
- 5) Die Dispersionsflüssigkeit wird entfernt und die Kapseln getrocknet. Das Produkt sollte als frei fließendes Pulver vorliegen.

Als Wandmaterial können zahlreiche makromolekulare Stoffe natürlicher und synthetischer Herkunft verwendet werden. Die Auswahl richtet sich nach der Art des Kernmaterials und den erstrebten Eigenschaften der Hülle.

Bei der Mikroverkapselung der Indikatorlösung wurde der Kapselinhalt von einer Polyamidmembran umhüllt⁽¹⁶⁾. Die Kapselprobe wies einen mittleren Durchmesser von 5 - 25 μm auf. Das gewünschte Kernmaterial darf in der Dispersionsflüssigkeit höchstens schwer löslich sein. Je geringer die Löslichkeit, umso geeigneter ist die Dispersionsflüssigkeit. Das Wandmaterial muß dagegen in der Dispersionsflüssigkeit löslich sein und muß in ihr koazerviert werden können. Unter diesen Voraussetzungen sind viele Dispersionsflüssigkeiten und Kernmaterialien denkbar und möglich.

6.1.2 Die Nanoverkapselung

Chemische Verbindungen wie Seifen, Detergentien oder kolloidale Elektrolyten, insgesamt Tenside, können ganz allgemein durch die Formel $R-X$ symbolisiert werden. R bedeutet dabei einen lipophilen und X einen hydrophilen Molekülanteil. Alle diese erwähnten Substanzen zeigen folgende Gemeinsamkeiten :

- 1) Sie besitzen amphipatische Eigenschaften, d.h. ihre Moleküle sind öllöslich und zugleich wasserlöslich.
- 2) Sie sind gewöhnlich stark grenzflächenaktiv in Lösung, d.h. sie reichern sich in Grenzflächen an und lösen dort durch ihre erhöhte Konzentration einen oft technisch bedeutsamen Effekt aus, wie z.B. Netz-, Wasch-, Emulgier- oder Dispergierwirkung.

- 3) Sie neigen dazu, in wässrigen und zum Teil auch in nicht-wässrigen Lösungen in engem, meist sehr niedrigem Konzentrationsbereich, der kritischen Mizellbildungskonzentration, durch Assoziation und Orientierung gleichartiger Molekülpertien, Aggregate zu bilden.
- 4) Ferner kann in Tensidlösungen vielfach eine dritte Komponente, das "Solubilisat", welches in dem betreffenden Lösungsmedium allein nicht oder kaum löslich ist, in erheblicher Menge klar verteilt werden. Dieses Phänomen wurde von Mc BAIN^(70,71) und seiner Schule zuerst intensiv bearbeitet und der Effekt "Solubilisierung" genannt.

Beim Herstellungsverfahren der Nanokapseln⁽⁹⁾ werden die durch Solubilisierung entstandenen wässrigen Mizellen, die den Indikator in gelöster Form enthalten, von einer Polyacrylmembran umgeben. Die Bildung dieser Membran wird durch Polymerisation des monomeren Wandmaterials mittels γ -Strahlen einer Kobalt-60-Quelle erreicht. Sind Lösungsmittel und Indikator z.B. in Hexan schlecht löslich, so können sie, im Gegensatz zu grenzflächenaktiven Stoffen, die sich an der Interphase anreichern, nicht aus der Mizelle entweichen.

Die von uns untersuchten Polyacrylkapseln hatten einen mittleren Durchmesser von 150 - 250 nm. Eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Kapselprobe zeigt Abb. 41. Mit Hilfe der nanoverkapselten Fluoreszenzmoleküle des pH-Indikators β -Methylumbelliferon^(14,17,75) (Fluoreszenzausbeute ca. 70%), konnten wir die fluorometrische pH-Wert-

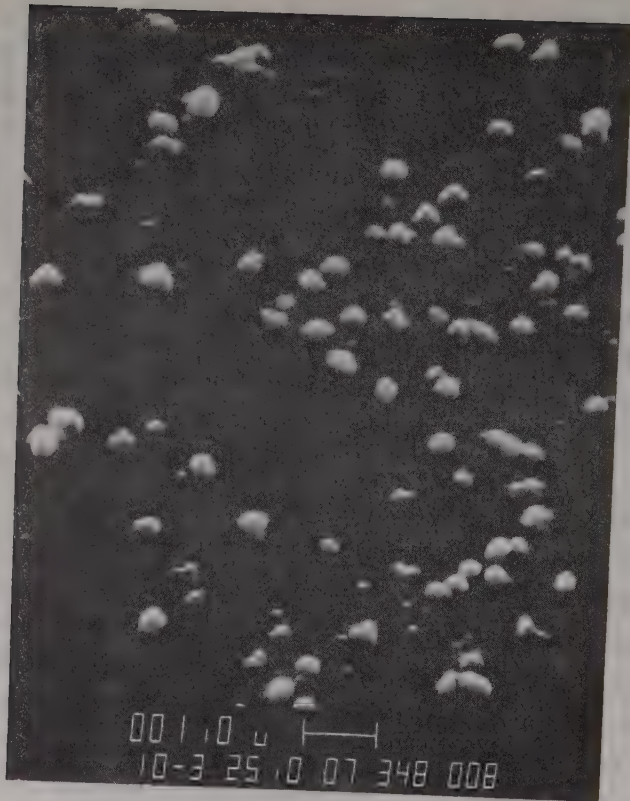


Abb.41 : Rasterelektronenmikroskopische
Aufnahme einer Indikator kapsel-
probe.($\varnothing = 150 - 250 \text{ nm}$)

Bestimmung realisieren, da sich die Kapselmembranen durch einen sehr geringen Diffusionskoeffizienten für CO_2 auszeichnen, für Protonen aber noch relativ hohe Permeabilität zeigen.

6.2 Quantitative fluorometrische Analyse der H^+ -Ionenkonzentration mit Hilfe des nanoverkapselten pH-Indikators β -Methylumbelliferon.

Auf die Möglichkeit der fluorometrischen Bestimmung der H^+ -Ionenkonzentration mittels pH-Indikatoren wurde bereits von verschiedenen Autoren^(45,47,17) hingewiesen. Ebenso wurde die fluorometrische Messung des pH-Wertes mit Indikatoren schon in einigen biologischen Objekten ausgeführt⁽¹⁰²⁾. Wie bereits erwähnt bestehen jedoch vom physiologischen Standpunkt aus gegenüber dieser pH-Meßmethode Bedenken, da toxische Einwirkungen des Indikators auf die biologischen Objekte nicht auszuschließen sind.

Die Anwendung des Optoden-Meßprinzips⁽⁶⁴⁾ kann diese Bedenken zwar ausräumen, da die Indikatorlösung durch eine für Protonen permeable Membran von dem Meßgut getrennt ist, jedoch tritt gerade durch die Phasentrennung eine neue Schwierigkeit auf, die durch den CO_2 -Einfluß biologischer Lösungen auf den pH-Wert bedingt ist.

Versuche in der makroskopischen Optode, mit Hilfe nicht-wässriger Indikatorlösungsmittel^(6,8,69) den CO_2 -Einfluß zu eliminieren, schlugen fehl, da wir keine Membran finden

konnten, die für Protonen durchlässig, für Wasser und insbesondere Wasserdampf jedoch undurchlässig war. Dazu kommt, daß viele nichtwässrige Lösungsmittel sehr hygroskopisch sind und pH-Indikatoren in derartigen Lösungsmitteln ihre charakteristischen Eigenschaften häufig mehr oder weniger einbüßen.

Ebenso dürfte eine differentielle pH-Wertbestimmung mit Hilfe zweier makroskopischer Optoden, wobei eine die durch CO_2 bedingte Änderung der H^+ -Ionenkonzentration bestimmt, die andere die pH-Änderung verursacht durch CO_2 und H^+ -Ionen, mehr theoretischer Natur bleiben, da dieses Verfahren, wegen der Nichtlinearität der pH- bzw. pCO_2 -Abhängigkeit des Indikators β -Methylumbelliferon, eine Mannigfaltigkeit an Eichkurven impliziert.

Das Problem, die geeignete Membran für die pH-Messung nach dem Optoden-Meßprinzip zu finden, d.h. eine Membran, die für Protonen permeabel, für CO_2 jedoch impermeabel ist, kann aber gelöst werden, wenn wir von der makroskopischen zur mikroskopischen Optode übergehen, also zu mikro- respektive nanoverkapselten Fluoreszenzindikatorenmolekülen. Dann besteht die Möglichkeit, durch das Herstellungsverfahren Einfluß auf die Selektivität dieser Kapselmembranen zu nehmen.

So kann z.B., nach Angaben der Herren SPEISER und BISSON, durch Zugabe von Aromaten, die sich durch eine besonders ausgeprägte Delokalisation ihrer Elektronen auszeichnen, erreicht werden, daß Protonen bevorzugt durch die Polyacrylmembran der Kapsel

transportiert werden und so in Konkurrenz mit den vorhandenen CO_2 -Molekülen treten. Ferner kann durch stärkere Vernetzung eine Engporigkeit des Polyacrylmateri als erzielt werden, so daß infolge des geringen Porendurchmessers der Kapselmembran für die CO_2 -Moleküle keine Permeationsmöglichkeit mehr existiert. Schließlich können durch Verwendung neuartiger Monomere, deren polymeres Endprodukt sich durch einen sehr geringen Diffusionskoeffizienten für CO_2 auszeichnet, die Anforderungen an die von uns erwünschten Kapselmembranen erfüllt werden.

Die CO_2 -Undurchlässigkeit dieser Kapselmembranen wurde von uns anhand verschiedener Untersuchungen nachgewiesen, die im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

6.2.1 Methoden zur Überprüfung der CO_2 -Undurchlässigkeit von Mikro- bzw. Nanokapseln.

Als Kriterien für die CO_2 -Undurchlässigkeit der Mikro- und Nanokapseln können gelten :

1) Der zeitliche Verlauf der Gleichgewichtseinstellung (Einstellkuve) ;

Abweichungen vom exponentiellen Verlauf der Äquilibration können auf möglicherweise stattfindende Konkurrenzprozesse hinweisen. (In unserem Fall Gleichgewichtseinstellung durch Diffusion von H^+ -Ionen wie auch eventuell durch Produktion von Protonen durch Dissoziation der Kohlensäure innerhalb der Mizelle.)

Bei allen untersuchten Kapselproben konnten wir keine signifikanten Abweichungen von den üblicherweise mit der $p\text{CO}_2$ -Optode erhaltenen Einstellkurven feststellen. Es sei allerdings hervorgehoben, daß diese Tatsache für sich allein noch nicht als eindeutiger Beweis für die CO_2 -Undurchlässigkeit der Kapseln angesehen werden kann, da einerseits die Gleichgewichtseinstellung des Meßendwertes bei Protonendiffusion kaum durch die langsame CO_2 -Diffusion beeinflusst wird, insbesondere gilt dies bei kurzen Einstellzeiten der fluorometrischen pH-Messung in der Größenordnung von 10 bis 20 sec (90%), andererseits es theoretisch durchaus denkbar ist, daß beide Prozesse mit dem selben Zeitverlauf auftreten, was bei einer Superposition zweier exponentieller Kurven wieder eine e-Funktion ergibt.

2) Das Einstellverhalten bei stark gepufferten Indikator-kapselsuspensionen ;

Da bei Begasung der Suspension mit CO_2 in der makroskopischen Optode der pH-Wert recht gut konstant bleibt müssen etwaige spektrale Veränderungen durch den CO_2 -Einfluß bedingt sein.

Bei dieser Versuchsdurchführung konnten wir über ca. 40 min eine langsam verlaufende Änderung des Signals aufzeichnen, die anfangs, bis etwa 25 min, proportional zur Zeit t verlief und dann in ein Gleichgewicht einmündete. Auch hier sei kritisch angemerkt, daß die Signaldrift durchaus auch durch die Protonendiffusion bedingt sein kann, da schließlich die Pufferkapazität endlich ist. Nimmt man dennoch einmal an,

daß die Signaländerung durch den CO_2 -Einfluß hervorgerufen worden ist, so kann man aus der für die Gesamtänderung benötigten CO_2 -Menge approximativ einen Diffusionskoeffizienten berechnen, den wir zu $D \approx 1 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{sec}$ bestimmten. Im Vergleich zu dem Diffusionskoeffizienten für CO_2 durch Teflon $D' = 1,9 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$ ist die Diffusion von CO_2 durch die Kapselmembran also vernachlässigbar klein.

3) Wie unter 2) Variation des pCO_2 in der Kapselsuspension bei konstantem pH-Wert ;

Bei CO_2 -Diffusion durch die Mizellmembran müßte dann der pH-Wert erniedrigt werden.

Dazu wurde die Bikarbonatkonzentration der Suspension in der Weise geändert, daß bei vorgegebenem pCO_2 der pH-Wert konstant bleibt, wie auch anschaulich aus der HENDERSON-HASSELBALCH'schen Gleichung (5.2.1-3) hervorgeht. Die Variation des pCO_2 wurde in drei Stufen von 7,5 über 75 bis 750 Torr vorgenommen.

Mit Berücksichtigung der Verdünnungsfehler der NaHCO_3 -Konzentrationen, die eher zu einer alkalischen Verschiebung der Anregungsspektren führten, konnte keine pH-Senkung bei hohen pCO_2 -Werten aufgefunden werden. Bei einem pCO_2 -Sprung von 75 auf 750 Torr, bei konstanter, 10^{-1} M NaHCO_3 -Konzentration, änderte sich der fluorometrisch ermittelte pH-Wert innerhalb der Kapsel nur um $\Delta \text{pH} = 0,91$ Einheiten, statt wie theoretisch zu erwarten um 1 Einheit.

4) Vergleich von elektrometrischer pH-Wertbestimmung der Suspension mittels einer Glaselektrode mit dem fluoro-

metrisch gemessenen pH-Wert, der aus einer pH-Eichkurve des Indikators bestimmt wurde. Man kann hier zusätzlich auch einen 2. pH-Indikator z.B. Dichlorfluorescein in die Suspension geben und so die pH-Werte innerhalb und außerhalb der Mizelle mit zwei verschiedenen Indikatoren fluorometrisch bestimmen.

Mit dieser Anordnung wurde fluorometrisch für die in der Mizelle befindliche H^+ -Ionenkonzentration ein pH-Wert von 6,44 gemessen, gegenüber einem pH-Wert der Außenlösung (elektrometrisch) von 6,26. An der Kapselmembran als Phasengrenze tritt also zwischen innerer und äußerer Lösung eine Potentialdifferenz von über 10 mV auf. Dieses Phänomen kann durch ein DONNAN-Gleichgewicht^(32,39,92) gedeutet werden, das dadurch zustande kommt, daß sich durch die aufgrund eines Konzentrationsgradienten diffundierenden H^+ -Ionen eine Potentialdifferenz aufbaut, die der weiteren Protonendiffusion entgegenwirkt. Aus dieser Potentialdifferenz ist zu folgern, daß sich keine oder sehr wenige HCO_3^- -Ionen in der Mizelle befinden, was auf eine sehr geringe CO_2 -Durchlässigkeit der Kapseln hinweist.

Aus all diesen angeführten Untersuchungen ist zu folgern, daß die Kapseln, wenn überhaupt, dann nur eine sehr geringe Permeabilität für CO_2 besitzen, die insbesondere bei relativ schnellen Einstellzeiten der H^+ -Ionenmessung eine vernachlässigbare Beeinflussung des Meßendwertes ausmachen dürfte. Wenn wir einmal im Widerspruch zu unseren Versuchsergebnissen annehmen, daß die Indikatorkapseln doch CO_2 -durchlässig sind,

dann können wir einen Orientierungswert berechnen, der die durch CO_2 -Einfluß bedingte pH-Wertänderung angibt und der, wie wir sehen werden, die obige Feststellung unterstützt.

Nimmt man bei einem pH von 6 der Innen- und Außenlösung, entsprechend $10^{-6} \text{ g (H}^+\text{-Ionen) / l}$, eine Protonenproduktion durch Dissoziation der Kohlensäure von gleichfalls 10^{-6} g/l innerhalb der Mizelle an, so würde das einen pH = 5,7 ergeben. Da durch den Konzentrationsgradienten aber eine Gleichverteilung der H^+ -Ionen durch Diffusion in die Außenlösung stattfindet, würde das bei einer Konzentration der Kapselsuspension von $c = 50 \text{ mg/ml}$ zu einem pH-Wert von :

$$\text{pH} = -\log \frac{50 \cdot 2 \cdot 10^{-6} + 950 \cdot 10^{-6}}{1000} = \underline{5,98} \text{ führen.}$$

An diesem Beispiel wird deutlich, daß auch bei angenommener CO_2 -Durchlässigkeit der Mizellen durch die relativ geringe Konzentration an Kapseln in der Suspension nur eine kleine pH-Änderung von $\Delta \text{pH} = 0,02$ Einheiten erfolgt. Bei einer Konzentration der Kapselsuspension von $c = 500 \text{ mg/ml}$ erhalten wir entsprechend ein $\Delta \text{pH} = 0,176$, bei $c = 5 \text{ mg/ml}$ ein $\Delta \text{pH} = 0,003$. Darüberhinaus ist bei dieser Berechnung zu berücksichtigen, daß wir mit 10^{-6} g/l eine relativ hohe Protonenproduktion durch CO_2 angenommen haben, so daß die wirkliche pH-Verschiebung bei auftretender CO_2 -Diffusion geringer ausfallen dürfte.

6.2.2 Eichkurve der fluorometrischen pH-Messung und weitere Meßergebnisse.

Für die pH-Messung verwendeten wir Polyacrylkapseln, die gesättigte Lösungen von β -Methylumbelliferon in 0,3 M NaHCO_3 enthielten und stellten von diesen Indikatorkapseln Suspensionen der Konzentration 50mg/ml in 10^{-3}M NaHCO_3 her. β -Methylumbelliferon ändert die spektrale Verteilung der korrigierten Anregungsspektren ($\lambda_{em} = 445\text{nm}$) in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die Auswertung der Spektren in einer Eichkurve erfolgt mittels des Formfaktors $F = S_1(\lambda_1)/S_2(\lambda_2)$ an zwei Wellenlängen (λ_1, λ_2), zwischen denen die Änderung der korrespondierenden Signale (S_1, S_2) maximal ist. Durch diesen Modus der Auftragung sind die korrigierten Anregungsspektren wieder gegen Änderungen der apparativen Verstärkung invariant.

Bei den korrigierten Anregungsspektren des verkapselten β -Methylumbelliferons konnten wir keine Verschiebung der Hauptbanden gegenüber dem freien Indikator feststellen. Somit scheint der Indikator mit der Kapselsubstanz nicht in Wechselwirkung zu treten. Ferner scheint auch bei der γ -Bestrahlung des Einkapselungsverfahrens das β -Methylumbelliferon keine chemische Veränderung der Bindungsverhältnisse innerhalb des Moleküls erlitten zu haben. Allerdings überlagert sich das Fluoreszenzsignal der Kunststoffkapseln dem eigentlichen Meßsignal, sodaß eine geringe scheinbare Verschiebung der Hauptbanden auftritt.

Weiterhin wurde festgestellt, daß Dimethylformamid, obgleich als organisches Lösungsmittel sehr reaktiv, die Polyacrylkapseln nicht angreift. Dazu wurde eine Kapselprobe mehrere Tage in Dimethylformamid gegeben und das Filtrat anschließend spektrofluorometrisch untersucht. Im Rahmen der Meßgenauigkeit unterschied es sich nicht von dem Spektrum des reinen Dimethylformamid. Da Dimethylformamid ein gutes Lösungsmittel für β -Methylumbelliferon ist, konnte somit auch gezeigt werden, daß alle Indikatormoleküle verkapselt sind.

Bei semilogarithmischer Auftragung des Formfaktors $F = S_1/S_2$ gegen den pH-Wert, konnten wir im physiologisch relevanten pH-Wertbereich von 6 bis 8 eine lineare Darstellung der Eichkurve erzielen (Abb. 42). Für pH-Werte kleiner als 6 ist analog zur pCO_2 -Optode^(64,81) die Grenze der Indikator-empfindlichkeit erreicht. Der Anwendungsbereich der fluorometrischen pH-Messung mit Hilfe des nanoverkapselten Indikators β -Methylumbelliferon ist auf der alkalischen Seite bis etwa zum pH-Wert 9 möglich. Um andere pH-Bereiche mit der pH-Mikro-Optode der Messung zu erschließen, müßten andere Indikatoren verwendet werden. Seitens der Indikatoren besteht dabei keine Schwierigkeit auch die gesamte pH-Skala zu erfassen. Die gebräuchlichsten pH-Fluoreszenzindikatoren können dabei Tabellen aus der Literatur entnommen werden^(45,47).

Zur Optimierung der H^+ -Ionenmessung können negative Gruppen in die Mizellmembran eingelagert werden, um physikalisch gelöste CO_2 -Moleküle abzustößen. Eine weitere CO_2 -Abdichtung

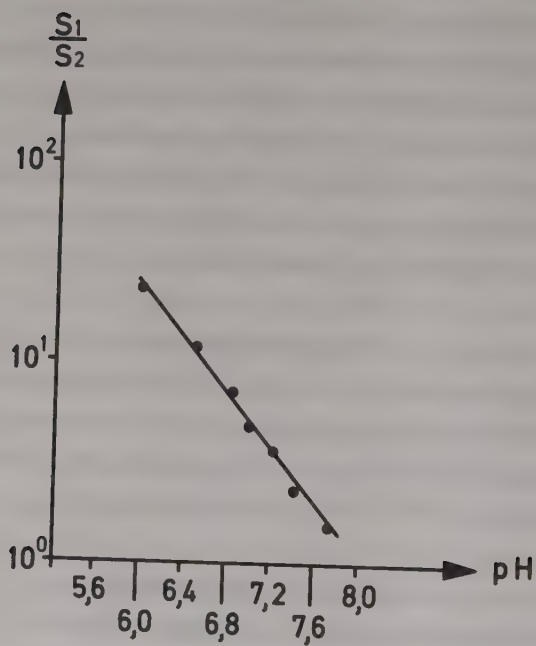


Abb.42 : Eichkurve der fluorometrischen pH-Messung
mit nanoverkapseltem β -Methylumbelliferon.

kann bei der Verkapselung durch längere γ -Bestrahlung erzielt werden. Um schnellere Einstellzeiten bei der pH-Messung zu erreichen, können größere Poren in die Kapselmembran eingebaut werden, was bei dem Herstellungsverfahren durch geringeren Zusatz an Vernetzer gesteuert werden kann.

D I S K U S S I O N

Bei der Fluoreszenzfotometrie mit Indikatoren in biologischen Medien wie Blut und Gewebe tritt das Problem auf, daß die wahren Indikatorspektren nicht eindeutig reproduziert werden können. Die Verzerrungen der Spektren werden dabei durch Konzentrationsänderungen des Indikators, Wechselwirkungen des Indikators mit anderen Substanzen, den Filtereffekt des Gewebes und Gewebeeigenfluoreszenz hervorgerufen.

Um diese Fehler aufdecken zu können, ist man auf eine Meßapparatur angewiesen, bei der die apparativ bedingten Fehler auf ein Minimum reduziert sind, so daß die wirklichen Spektren (korrigierte Spektren) erfaßt werden können. Unter korrigierten Spektren ist dabei zu verstehen, daß alle Apparatecharakteristika wie die Emissionscharakteristik der Strahlungsquelle, die Übertragungsfunktion der Optik und die Empfangscharakteristik des Fotomultipliers eliminiert sind. Darüberhinaus muß dieses Gerät den erforderlichen Spektralbereich lückenlos erfassen und die Möglichkeit bieten, korrigierte Spektren sowohl in " Anregung " als auch in " Emission " aufzunehmen.

Um die apparativen Voraussetzungen für die Untersuchungen mit Indikatoren zu schaffen, wurde von BOLDT⁽¹²⁾ und LÜBBERS ein korrigiert messendes Spektrofluorometer entwickelt, das sich durch hohe Meßgenauigkeit und Empfindlichkeit auszeichnet. Zudem ergaben Untersuchungen zur Langzeitstabilität, daß sich nach einer gewissen Aufheizzeit die Meßwerte bis auf eine

geringe Streubreite stabilisieren. Das korrigiert messende Spektrofluorometer erfüllt damit alle gestellten Anforderungen und eignet sich überdies auch zur Messung an trüben Medien, da die Fluoreszenzstrahlung gemessen wird, die nach erfolgter Anregung an der Frontseite der Probenküvette emittiert wird. Bei trüben Medien ist das die einzige mögliche Art der Fluoreszenzmessung.

Nachdem seitens der Apparatur alle Bedingungen für eine erfolgreiche Fehleranalyse im Hinblick auf die Indikatorfluorometrie in biologischen Objekten erfüllt waren, bestand die Aufgabe, die verschiedenen Ursachen für die Verzerrungen der Indikatorspektren herauszufinden und durch geeignete Maßnahmen entweder gänzlich zu eliminieren oder doch zumindest weitgehend zu reduzieren.

Eine Möglichkeit dazu bietet sich an, wenn man spezielle Indikatoren verwendet, die ihre spektrale Verteilung in Abhängigkeit von der Reaktion ändern. Als Beispiel benutzten wir den pH-Indikator β -Methylumbelliferon, der unterschiedliche Anregungsspektren für die dissoziierte und undissoziierte Form aufweist, mit einem isosbestischen Punkt bei $\lambda = 330\text{nm}$. In derartigen Fällen kann die reaktionsabhängige Änderung der Spektralverteilung durch einen Formfaktor erfaßt werden, (wie auch ausführlich im 4. und 5. Kapitel beschrieben wurde), der gegen Konzentrationsänderungen in bestimmten Konzentrationsbereichen sowie gegen Änderungen der apparativen Verstärkung invariant ist.

Andere Indikatoren, wie z.B. Pyrenbuttersäure, zeigen dagegen bei entsprechender Reaktion (in diesem Fall Fluoreszenzlöschung) keine Änderung der Spektralverteilung sondern lediglich ein proportionales Änderungsverhalten, so daß die Auswertung der Spektren nicht mehr mit Hilfe eines Formfaktors erfolgen kann. Proportionale Verzerrungen der Spektren durch Konzentrationsänderungen und Schwankungen der apparativen Verstärkung müssen dann durch besondere Messungen berücksichtigt werden. Insbesondere gilt dies auch bei nichtlinearen Verzerrungen der Indikatorspektren, bedingt durch den Filtereffekt und die Eigenfluoreszenz des Gewebes sowie durch Wechselwirkungen der Indikatormoleküle mit Molekülen der Meßsubstanz.

Um aber den Meßaufwand in vertretbaren Grenzen zu halten, ist es notwendig, entweder durch ein geeignetes Auswerteverfahren oder durch eine besondere methodische Entwicklung gegen die erwähnten Fehler zu diskriminieren. Ein solches Auswerteverfahren ist von WODICK und LÜBBERS⁽¹¹²⁾ bereits mit der Queranalyse bzw. der erweiterten Queranalyse erstellt und ausführlich beschrieben worden^(67,68). Es muß aber darauf hingewiesen werden, daß dieses Verfahren relativ kompliziert ist, so daß es wünschenswert erschien, mit Hilfe einer geeigneten Meßsonde die Quantifizierung biologischer Prozesse zu ermöglichen.

Durch die Konstruktion einer speziellen Fluoreszenzanordnung, Optode genannt, konnten wir bei relativ geringem Meß-

aufwand das gesteckte Ziel erreichen. Im einzelnen werden bei der Optode die Fehler durch folgende Konstruktionsmerkmale eliminiert :

Durch die Trennung der Indikatorlösung vom biologischen Meßgut durch eine für die zu messenden Stoffe permeablen Membran erhalten wir die Konzentration der Indikatorlösung konstant, da diese im Indikatorlösungsraum dicht abgeschlossen ist. Da die Membran im Idealfall nur für die zu messenden Stoffe selektiv durchlässig ist, werden ferner toxische Einwirkungen und Verzerrungen der Indikatorspektren aufgrund chemischer Wechselwirkungen zwischen Fluoreszenzindikatormolekülen und Molekülen der Meßsubstanz ausgeschlossen.

Die durch das biologische Objekt bedingte Filterung der Anregungs- bzw. Fluoreszenzstrahlung wird dadurch elimiert, daß die Indikatorlösung bei der optischen Messung vor dem Meßgut angeordnet ist.

Schließlich wird bei entsprechend hoher Indikatorkonzentration der Lösung die Eigenfluoreszenz des Meßobjekts vernachlässigbar gering bzw. kann sie durch Verspiegelung oder Schwärzung einer Membranfläche vollständig eliminiert werden.

Damit konnte anhand der makroskopischen Optode die Eignung der Fluoreszenzphotometrie mit Indikatoren zur quantitativen Analyse biologischer Stoffe prinzipiell gezeigt werden. Der eigentlich kritische Punkt dieser neuen Meßmethode besteht darin, daß einige Fluoreszenzindikatoren infolge der

Bestrahlung ausbleichen, d.h., daß mit zunehmender Bestrahlungszeit die Fluoreszenzintensität partiell oder vollständig abklingt.

Bei Untersuchungen über die Langzeitstabilität der pO_2 -Optode konnte dieser Effekt auch bei der langwelligen Emissionsbande der Pyrenbuttersäurefluoreszenz beobachtet werden, jedoch zeigte sich im Anregungsspektrum keine derartige Wirkung. Die Stabilität gegenüber Bestrahlung wurde dabei durch Aufnahme der Gesamtempfindlichkeit und Linearität der pO_2 -Eichkurve nachgewiesen. Ebenso konnten bei dem pH-Indikator β -Methylumbelliferon keine Änderungen der Anregungs- bzw. Emissionsspektren festgestellt werden. Gealterte Pyrenbuttersäure, also eine Indikatorlösung der Substanz, bei der infolge der Bestrahlung die langwellige Emissionsbande abgesunken war, konnte in Verbindung mit dem Indikator β -Methylumbelliferon besonders gut zur simultanen pO_2 - pCO_2 -Messung verwendet werden, da die Emissionshauptbanden beider Indikatoren durch den Ausbleicheffekt nur mehr geringfügig überlagerten.

Auch bei den Ausbleicheffekten unterscheidet man zweckmäßigerweise zwischen linearen und nichtlinearen Verzerrungen. Proportionale Änderungen der Spektralverteilung können dabei wieder gegebenenfalls durch einen Formfaktor eliminiert werden, wenn die Änderungen mit genügend großer Zeitkonstante erfolgen. Ist eine Formfaktorbildung aufgrund der Reaktionscharakteristik nicht möglich, so müssen wie bei nichtlinearen Verzerrungen infolge des Ausbleicheffekts besondere Korrekturmaßnahmen getroffen werden.

Um mit Hilfe des Optoden-Meßprinzips auch Messungen in biologischen Strukturen der Größenordnung μm (z.B. Kapillaren) durchführen zu können, wurde die makroskopische Optode in den Mikromaßstab übersetzt. Diese Übertragung in den Mikrobereich konnte dank der Technologie der Mikro-^(16,73) bzw. Nanoverkapselung⁽⁹⁾ erfolgen. Zudem gestatten es die Herstellungsverfahren der Mikro- und Nanokapseln, Einfluß auf die Selektivität der Kapselmembranen zu nehmen.

So war es beispielsweise möglich, mit Hilfe Protonen selektiver Kapselmembranen, die für CO_2 -Moleküle undurchlässig sind, die fluorometrische H^+ -Ionenmessung auf der Basis des Optoden-Meßprinzips im Mikrobereich zu realisieren.

Die Steuerung der Selektivität von Membranen ist besonders dann von Bedeutung, wenn die Fluoreszenz eines Indikators durch mehrere Stoffe beeinflußt wird. So wird z.B. die Fluoreszenz von Pyrenbuttersäurelösungen, die eine wässrige Komponente enthalten, neben O_2 auch durch CO_2 gelöscht, so daß es in diesen Fällen erforderlich ist, das Verkapselungsverfahren entsprechend abzuwandeln.

Ebenso können die Mikro- bzw. Nanokapseln auch zur CO_2 -Bestimmung verwendet werden, wenn das Herstellungsverfahren in geeigneter Weise modifiziert wird. So müssen in diesem Fall die Kapselmembranen für CO_2 durchlässig, für Protonen dagegen undurchlässig sein. Diese Anforderung kann durch Markierung der Membranporen mit positiven Ladungen (z.B. copolymere Säuren) erfüllt werden. Mit Hilfe von " Ionen-carriern " sollte es bei geeigneten Fluoreszenzindikatoren

auch möglich sein, andere Ionen wie z.B. K^+ , Na^+ und Ca^{++} fluorometrisch zu messen.

Mit Hilfe des Optoden-Meßprinzips bieten sich auch weiterhin zahlreiche Untersuchungs- und Entwicklungsmöglichkeiten an, von denen einige zum Schluß beispielhaft aufgezeigt werden sollen.

Speziell zur biomedizinischen Anwendung der quantitativen Indikatorfluorometrie bietet sich die Entwicklung eines "2A-Optoden-Fluorometers" an, das weit weniger technischen Aufwands bedarf als das im 1. Kapitel beschriebene KSPF nach BOLDT und LÜBBERS. Die Ankopplung an die zu untersuchenden biologischen Objekte könnte dabei mittels eines UV-Lichtleiters realisiert werden, dessen objektseitiges Ende mit einer miniaturisierten pO_2 -, pCO_2 - bzw. kombinierten pO_2 - pCO_2 - oder pH-Optode bedeckt ist. Mit einer derartigen "Katheter-Optode" könnten die Messungen auch an schwer zugänglichen Stellen, z.B. an Organen durchgeführt werden. Der Lichtleiter dient dabei der Zuführung der Anregungsstrahlung an den Meßort und zur Rückführung des Fluoreszenzsignals.

Neben der Messung extensiver Größen mit Hilfe des Optoden-Meßprinzips dürften auch der Bestimmung intensiver Größen wie Druck und Temperatur keine bedeutenden Schwierigkeiten entgegenstehen. Besonders die Fluoreszenzlöschung zeigt bei entsprechenden Indikatoren einen signifikanten Temperaturgang. Die Konzentrationsabhängigkeit des Indikators β -Methylumbelliferon könnte mit Hilfe einer den osmotrischen Meßzellen⁽⁸²⁾ analogen Konstruktion zur fluorometrischen

Bestimmung des osmotischen Druckes dienen.

Eine über die vorgestellten Anwendungsmöglichkeiten erzielbare Ausweitung des Optoden-Meßprinzips wird wesentlich von den Eigenschaften der Indikatoren bestimmt sein.

Systematische Untersuchungen an Fluoreszenzindikatoren der verschiedensten species dürften daher eine Expansion der fluorometrischen Meßmethoden ermöglichen. Einen ebenso wichtigen Gesichtspunkt stellt allerdings die für die Messungen verwendete Membran dar, die mit ihrer spezifischen Eigenschaft der Selektivität einen bedeutungsvollen Einfluß auf die Messung der Stoffe ausübt. Die Membranforschung befindet sich gegenwärtig noch in vollem Fluß, so daß sich auch hier wertvolle neue Anwendungsmöglichkeiten ergeben dürften.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Das Ziel dieser Arbeit, die quantitative Fluoreszenzfotometrie mit Indikatoren, machte es erforderlich, detaillierte Untersuchungen über systematische und statistische Fehler des zu den Messungen zur Verfügung stehenden korrigiert messenden Spektrofluorometers nach BOLDT⁽¹²⁾ und LÜBBERS durchzuführen und diese so weit wie möglich zu eliminieren bzw. zu reduzieren.

Diesem 2. Kapitel haben wir im 3. Kapitel theoretische Betrachtungen und experimentelle Befunde verschiedener Autoren zur Empfindlichkeit anderer lichtdetektierbarer Methoden angefügt, um einen allgemeinen Überblick über den gegenwärtigen Stand der Technologie auf diesem Gebiet zu vermitteln. Die eigentliche Fluoreszenzfotometrie mit Indikatoren schließt sich dann im 4. Kapitel dieser Arbeit an, in dem anhand zahlreicher Voruntersuchungen die für die Spektrofluorometrie wichtigen, typischen Eigenschaften der verwendeten Indikatoren aufgeführt werden.

In dem anwendungsbezogenen 5. Kapitel konnten wir, basierend auf den Voruntersuchungen des 4. Kapitels, mit Hilfe der Fluoreszenzfotometrie mit Indikatoren eine optische, für Routineuntersuchungen wenig störanfällige Methode zur Blutgasanalyse entwickeln. Grundlage der quantitativen Analyse der Blutgase sowie der simultanen pO_2 - pCO_2 -Messung ist das Optoden-Meßprinzip :

Eine Fluoreszenzindikatorlösung ist durch eine für die zu messenden Blutgase permeablen Membran von der Meßgutkammer getrennt. Das zu messende Gas diffundiert in die Indikatorlösung und tritt mit den Fluoreszenzmolekülen in chemische bzw. physikalische Wechselwirkung.

Die Änderungen der Indikatorfluoreszenz können durch ein Quarzfenster, das die optische Seite des Indikatorraums abdeckt, mit einem Fluorometer aufgezeichnet werden.

Damit werden durch das Optoden-Meßprinzip Fehler eliminiert, wie sie bei der Indikatorfluorometrie im Gewebe auftreten, z.B. Konzentrationsänderungen des Indikators, Wechselwirkungen des Indikators mit Gewebesubstanzen und der Filtereffekt des Gewebes.

In allen Fällen (Einzelmessung und Simultanmessung) konnten wir eine linearisierte Darstellung der Eichkurven angeben. Auf 90% des Endwertes bezogen erhielten wir mit einer 6 μ m-Teflonmembran Einstellzeiten von 3-4sec ($p\text{CO}_2$ -Optode), 2-3sec ($p\text{O}_2$ -Optode), 8-10sec ($p\text{CO}_2$ simultan) und um 6sec ($p\text{O}_2$ simultan). Bei Zugabe von Carboanhydrase konnten wir bei der $p\text{CO}_2$ -Optode eine Einstellzeit erzielen, die etwa bei einer Sekunde lag (90%). Im Gegensatz zu $p\text{O}_2$ -Elektroden werden bei der $p\text{O}_2$ -Optode die Meßendwerte nicht durch Sauerstoffeigenverbrauch beeinflusst. Aus jeweils 10 Messungen wurde bei einem $p\text{O}_2$ von 155 Torr die Standardabweichung zu $\bar{S} = \pm 1,3\%$ bestimmt, bei einem $p\text{CO}_2$ von 36,5 Torr zu $\bar{S} = \pm 2\%$. Im Vergleich zu den Messungen mit Einzeloptoden konnten bei der Messung mit der kombinierten Optode keine Einbußen hinsichtlich Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Meßwerte festgestellt werden.

Anhand der Messung des oberflächlichen pO_2 am schlagenden Meerschweinchenherzen in situ konnte gezeigt werden, daß sich das Optoden-Meßprinzip auch für biomedizinische Anwendungen eignet.

Im 6. Kapitel wird die Miniaturisierung der makroskopischen Optode in bis zu submikroskopische Größenbereiche mittels mikro- bzw. nanoverkapselter Fluoreszenzindikatormoleküle beschrieben. Mit diesen Mikro- bzw. Nanosonden können physiologische Parameter in biologischen Strukturen der Größenordnung μm (z.B. Kapillaren) gemessen werden.

Darüberhinaus ermöglicht gerade die Technologie der Verkapselung eine effizientere Steuerung der Selektivität dieser Kapselmembranen gegenüber den üblicherweise gefertigten makroskopischen Membranflächen. Als Folge davon ergab sich die Möglichkeit, das Optoden-Meßprinzip auch auf Ionenmessungen zu erweitern, wie am Beispiel der H^+ -Ionenmessung dargelegt wurde.

Auch bei der fluorometrischen pH-Messung mit nanoverkapseltem β -Methylumbelliferon konnten wir im physiologisch relevanten pH-Wertbereich von 6 bis 8 eine linearisierte Darstellung der Eichkurve angeben.

In der Diskussion dieser Arbeit wurde schließlich das Problem der Fluoreszenzfotometrie mit Indikatoren in biologischen Medien kritisch analysiert und auf die allgemeine Bedeutung und Verwendung des Optoden-Meßprinzips eingegangen.

- 14) BÜLOW, C. und W. DIECK : B-Methylumbelliferon als fluoreszierender Indikator
Fres. Z. Anal. Chem. 1928, 75, 81-86
- 15) BUNGENBERG de JONG, H.G. : Colloid Science II, ed. KRUYT, H.R.,
Elsevier Publ. Corp. Inc.,
New York 1949, 339-396
- 16) CHANG, T.M.S.,
MAC INTOSH, F.C. and
MASON, S.G. : Canadian J. of Physiol. and Pharmacol.
44, 115-128, 1966
- 17) CHEN, R.F. : Fluorescent pH-indicators :
Spectral changes of 4 methylum-
belliferone
Anal. Letters 1(7), 423-428, (1968)
Am. Soc. Art. Int. Organs 2, 41, 1956
- 18) CLARK, L.C. Jr. : Oxygen Transport to Tissue
eds. H.I. BICHER and D.F. BRULEY
op. 127, Plenum Press, New York 1973
- 19) CLARK, L.C. Jr. and
E.W. CLARK : Detecting weak light signals
J. Opt. Soc. Am. 58, 841, 1967
- 20) CLEARY, J. : Biol. Bull., Woods Hole 141, 382, 1971
- 21) COHEN, L.B.,
DAVILA, H.V. and
A.S. WAGGONER : Changes in fluorescence of squid
axons during activity
Biol. Bull., Woods Hole 139, 418, 1970
- 22) COHEN, L.B.,
LANDOWNE, D.,
SHRIVASTAV, B.B. and
J.M. RITCHIE : A fully compensated versatile
spectrofluorimeter
J. Sci. Instr., Series 2, Vol. 1,
305, 1968
- 23) CUNDALL, R.B. and
G.B. EVANS : A large change in axon fluorescence
that provides a promising method
for measuring membrane potential
Nature New Biol., Vol. 241, 1973
- 24) DAVILA, H.V.,
SALZBERG, B.M.,
COHEN, L.B. and
A.S. WAGGONER : Mitt. Dtsch. Pharmaz. Ges. 40, 117,
1970
- 25) DETERMANN, H. und
K. LAMPERT : Z. physik. Chemie 30, 130, 1961
- 26) EIGEN, M.,
KUSTIN, K. und
G. MAASS : An artificial indicator for electric
phenomena in biological membranes
and interfaces
Naturwissensch. 56, 514, 1969
- 27) EMRICH, H.M.,
JUNGE, W. and
H.T. WITT :

- 28) EVANS, R.D. : The atomic nucleus
Mc Graw Hill Book Comp., Inc.,
New York 1955, Chap. 28
- 29) FABEL, H. und
D.W. LÜBBERS : Measurements of reflexion spectra
of the beating rabbit heart in situ
Bio. Z. 341, 351, 1965
- 30) FINKELNBURG, W. : Einführung in die Atomphysik
Springer Verl. Berlin-Heidelb.-N.Y.
1967
- 31) FÖRSTER, Th. : Fluoreszenz Organischer Verbindungen
Vandenhoek & Ruprecht, Göttingen
1951
- 32) FORKER, W. : Elektrochemische Kinetik
Akademie Verl. Berlin, 1966
- 33) FRANKLIN, M.L.,
HORLICK, G. and
H.V. MALMSTADT : Basic and practical considerations
in utilizing photon counting for
quantitative spectrochemical methods
Anal. Chem. 41, 2-10, 1969
- 34) GAMBINO, R. : Clin. Chem. 7, 336, 1961
- 35) GERTZ, K.H. und
H.H. LOESCHKE : Naturwissensch. 45, 160, 1958
- 36) GLEICHMANN, U. und
D.W. LÜBBERS : Pflüg. Arch. ges. Physiol. 274, 456, 1960
- 37) GLEICHMANN, U. und
D.W. LÜBBERS : Pflüg. Arch. ges. Physiol. 271, 431, 1960
- 38) GUILBAULT, G.G. : Practical fluorescence
Marcel Dekker, Inc., N.Y. 1973
- 39) HAASE, R. : Transportvorgänge
Steinkopff Verl., Darmstadt 1973,
Bd. III,
- 40) HALLETT, M.,
SCHNEIDER, A.S. and
E. CARBONE : Tetracycline fluorescence as
calcium probe for nerve membrane
with some model studies using
erythrocyte ghosts
J. Membrane Biol. 10, 31-44, 1972
- 41) HELBIG, E. : Lichtmeßtechnik
Akad. Verlagsges. Geest u. Portig K.G.
Leipzig 1972
- 42) HERCULES, D.M. : Fluorescence and phosphorescence
analysis
J. Wiley & Sons, N.Y.-London-Sydney

- 43) HERTZ, C.H. and B.SIESJÖ : Acta Physiol.Scand.47,115,1959
- 44) HEYROWSKI, Ch. : Researches with dropping mercury cathode
Re.trav.Chim.(Holland)44(1923-24) 496
- 45) JENSEN, K.A. : Fluoreszierende Indikatoren II
Fres.Z.Anal.Chem.1939, Berlin 117, 50-51
- 46) JOST, W. : Diffusion in solids, liquids, gases
Acad. Press Inc., Publishers N.Y.1960
- 47) KAVANAGH, F. and R.O.GOODWIN : Organ.Chem.Bull.22, No.4, 1-4
Fluorescent indicators
- 48) KIRCHNER, M. und H.WOLTER : Zur Kennzeichnung der Farbeigenschaften von Körperfarben durch Farboperatoren
Z.Angew.Phys.21, 6, 549, 1966
- 49) KITTEL, Ch. : Einführung in die Festkörperphysik
R. Oldenbourg Verl. München-Wien 1969
- 50) KNOPP, J.A. and I.S.LONGMUIR : Intracellular measurement of oxygen by quenching of fluorescence of pyrenebutyric acid
Biochim.Biophys.Acta, 279, 1972 393-397
- 51) KOCSIS, E.A. and E.PETTKO : Fres.Z.Anal.Chem., Berlin 124, 45-48, 1942
Über einige neue Lumineszenzindikatoren
- 52) KOCSIS, E.A., ZADOR, G.Y. and J.F.KALLOS : Lumineszenz-Titrationen I, II
Z.Anal.Chem.126, 1943
- 53) KOMPANEYETS, A.S. : Theoretical Physics
MIR Publishers Moscow 1965
- 54) KONEV, S.V. : Fluorescence and phosphorescence of proteins and nucleic acids
Plenum Press N.Y.1967
- 55) KORTUM, G. : Kolorimetrie, Photometrie und Spektrometrie
Springer Verl.1962, Bd.II

- 56) KORTÜM, G. : Reflexionsspektroskopie
Springer Verl. Berlin-Heidelb.
New York 1969
- 57) KUNZE, K.,
LÜBBERS, D.W. und
E. WINDISCH : Die Messung des absoluten
Sauerstoffdruckes mit der
Kammer-Pt-Elektrode in
beliebigen Medien, insbesondere
im Blut und Gewebe.
Pflüg. Arch. ges. Physiol. 276,
415, 1963
- 58) KUSTIN, K. : Methods in enzymology, Vol. XVI:
Fast reactions
Acad. Press, N.Y.-London 1969
- 59) LANDAU, L. et
E. LIFCHITZ : Editions MIR Moscou, Tome II, III,
IV, VI, VIII
- 60) LAU, H.K.Y. and
G.G. GUILBAULT : Fluorometric methods of analysis
on silicone rubber pads
Fluorescence News Vol. 8, No. 2,
1974
- 61) LÜBBERS, D.W. und
W. NIESEL : Über die Auswertung von spektralen
Veränderungen in biologischen
Objekten
Naturwiss. 44, 59, 1957
- 62) LÜBBERS, D.W. und
W. NIESEL : Ein Kurzzeitspektralanalysator
zur Registrierung rasch verlaufen-
der Änderungen der Absorption
Naturwiss. 44, 60, 1957
- 63) LÜBBERS, D.W. und
W. NIESEL : Der Kurzzeitspektralanalysator :
Ein schnell arbeitendes Spektral-
photometer zur laufenden Messung
von Absorptions- bzw. Extinktions-
spektren.
Pflüg. Arch. ges. Physiol. 268, 286,
1959
- 64) LÜBBERS, D.W. und
N. OPITZ : Die $p\text{CO}_2$ -/ $p\text{O}_2$ -Optode : Eine neue
 $p\text{CO}_2$ - bzw. $p\text{O}_2$ -Meßsonde zur Messung
des $p\text{CO}_2$ oder $p\text{O}_2$ von Gasen und
Flüssigkeiten.
Z. Naturforsch. 30c, 532-533, 1975
- 65) LÜBBERS, D.W. und
N. OPITZ : Quantitative fluorescence photo-
metry with biological fluids and
gases
"2nd Int. Symp. on Oxygen Transport
to Tissue, Mainz 1975", in press:
Plenum Publ. Corp. New York

- 66) LÜBBERS, D.W. and N. OPITZ :
The "pO₂-Optode", a new tool to measure pO₂ of biological gases and fluids by quantitative fluorescence photometry. Pflüg. Arch. 359, Suppl. 1975, p. R145, No. 290
- 67) LÜBBERS, D.W. and R. WODICK :
The examination of multicomponent systems in biological materials by means of a rapid scanning photometer. Appl. Optics 8, 1055, 1969
- 68) LÜBBERS, D.W. und R. WODICK :
Schnelle Photometrie komplizierter biochemischer Mehrkomponentensysteme. Z. Anal. Chem. 261, 271-280, 1972
- 69) LUDER, W.F. and ZUFFANTI, S. :
The electronic theory of acids and bases
Dover Publ. Inc., New York 1961
- 70) Mc BAIN, M.E.L. and E. HUTCHINSON :
Solubilization and related phenomena
Acad. Press, London & N.Y. 1955
- 71) Mc BAIN, J.W. :
Colloid Science, Heath, Boston, 1950
- 72) MELHUISE, W.H. :
Calibration of spectrofluorimeters for measuring corrected emission spectra. J. Opt. Soc. Am., Vol. 52, No. 11, 1256, 1962
- 73) MERKLE, H.P. :
Zur Mikroverkapselung fester Arzneistoffe mittels Koazervation
Diss. Nr. 4741, ETH-Zürich, 1972
- 74) NAKAMURA, J.K. and S.E. SCHWARZ :
Appl. Opt. 7, 1073, 1968
- 75) NAKASHIMA, M., SOUSA, J.A. and R.C. CLAPP :
Spectroscopic species of 4methylumbelliferon in water and ethanol. Nature Phys. Sci. 235, 1972, 16
- 76) NETTER, H. :
Theoretische Biochemie
Springer Verl. 1959
- 77) NIESEL, W., LÜBBERS, D.W. and G. THEWS :
Die Verfolgung schneller Reaktionen durch Aufnahme von Summenspektren mit Hilfe des Kurzzeit-spektralanalysators. Z. elektr. Chem., Ber. Bunsenges. phys. Chemie 64, 15, 1960

- 78) NIESEL, W.,
LÜBBERS, D.W.,
SCHNEEWOLF, D.,
RICHTER, J. and
W. BOTTICHER :
A double beam spectrometer with
10ms recording time.
Rev.Sci.Instr. 35, 578, 1964, No. 5
- 79) NIKOLIC, K.,
VELASEVIC, K. et al.
Glasnik Hemiskog, Drustva, Beograd,
31, 9-10, 393-397, 1968
- 80) OPITZ, E. und
H. BARTELS :
Hoppe-Seyler/Thierfelder, Springer
Verl. 1955.
Gasanalyse, in: Handbuch der Physiol.
und Patholog. Chem. Analyse
- 81) OPITZ, N. and
D.W. LÜBBERS :
Pflüg. Arch. 355, Suppl. 1975, p. R120,
No. 240
A new fast responding optical
method to measure pCO_2 in gases
and solutions.
- 82) OPITZ, N. :
Osmotische Messungen an wässrigen
Polyäthylenglykol-Lösungen
Diplomarbeit, Aachen 1972
- 83) OPITZ, N. and
D.W. LÜBBERS :
Simultaneous measurement of blood
gases by means of fluorescence
indicators.
Pflüg. Arch. 362, Suppl. 1976, p. R52,
No. 208
- 84) PAO, Y.-H. and
J.E. GRIFFITHS :
Performance of a new photoelectric
detection method for high resolution
optical spectroscopy.
I. Investigation of basic Charac-
teristics.
J. Chem. Phys. Vol. 46, No. 5, 1671, 1967
- 85) PAO, Y.-H.,
ZITTER, R.N. and
J.E. GRIFFITHS :
New method of detecting weak light
signals
J. Opt. Soc. Am. Vol. 56, No. 8, 1133, 1966
- 86) PAPAYAN, G.V. and
Y.M. ROZANOV :
Sov. J. Opt. Technol. 36, 736, 1969
- 87) PARKER, C.A. :
Spectrofluorometer calibration
in the ultraviolet region.
Anal. Chem. 34, 502, 1962
- 88) RAMETTE, R.W. and
E.R. SANDELL :
Rhodamine B equilibria
Am. Chem. Soc. 78, 4872-4878, 1956
- 89) RCA
Photomultiplier Manual
Technical Series PT-61
- 90) ROBBEN, F. :
Noise in the measurement of light
with photomultipliers
Appl. Opt. 10, 776, 1971

- 91) ROLFE, J. and S.E. MOORE : Appl. Opt. 9, 63, 1970
- 92) SCHLÖGL, R. : Stofftransport durch Membranen
Steinkopff-Verl., Darmstadt 1964
- 93) SCHULZ, G.V. : Z. Elektrochem. 60, 199, 1956
- 94) SCHWABE, K. : pH-Meßtechnik
Verl. Th. Steinkopff, Dresden u.
Leipzig 1963
- 95) SCHWANTES, R.C., HANNAN, H.J. and A. van der ZIEL : Flicker noise in secondary emission
tubes and multiplier phototubes
J. Appl. Phys. 27, No. 6, 573, 1956
- 96) SEWERINGHAUS, J.W. and A.F. BRADLEY : J. Appl. Physiol. 13, 515, 1958
- 97) SNELL, F.M. : J. Appl. Physiol. 15, 729, 1960
- 98) STEINER and WEINRYB : Excited states of proteins and
nucleic acids
Plenum Press, N.Y. 1971
- 99) STERN, O. and M. VOLMER : Z. Phys., 20, 1919, 183
- 100) STOW, R.W. and B.F. RANDALL : Am. J. PHYSIOL. 172, 678, 1954
- 101) STUART, H.A. : Physik der Hochpolymeren; Bd. II :
Das Makromolekül in Lösungen
Springer Verl. 1953
- 102) TAGEEVA, S.V., KOSHELEVA, G.N. and A.P. DUBROV : Determination of hydrogen ions
concentration in some biological
objects with fluorescent
indicators (russ.)
Tsitologiya(13)1, 1971, 122-125
- 103) TASAKI, I., WATANABE, A. and M. HALLITT : Fluorescence of squid axon membrane
labelled with hydrophobic probes
J. Membrane Biol. 8, 109, 1972
- 104) THAER, A.A. and M. SERNETZ : Springer Verl. 1973
Fluorescence techniques in
cell biology
- 105) THEWS, C. und D.W. LÜBBERS : Ein schnell registrierendes
Absorptions-Spektralphotometer
Z. Angew. Phys. 7, 325, 1955
- 106) TULL, R.G. : A comparison of photon counting
and current measuring techniques
in spectrophotometry of faint
sources
Appl. Opt. 1968, Vol. 7, No. 10, 2023

- 107) UDENFRIEND, S. : Fluorescence assay in biology and medicine
Acad. Press, Vol. II, N. Y. - London 1969
- 108) VALVO Fotovervielfacher
Ausgabe Dez. 1969
- 109) VAUGHAN, W. M. and G. WEBER : Oxygen quenching of pyrenebutyric acid fluorescence in water.
A dynamic probe of the micro-environment.
Biochem. J., 1970, 464
- 110) WODICK, R. : Die Auswertung von Mehrkomponentensystemen der Kurzzeitspektrophotometrie
Diss. Marburg 1968
- 111) WODICK, R. und D. W. LÜBBERS : Reflexionsphotometrische Analyse von inhomogen verteilten Farbstoffgemischen an lebenden Geweben mit Hilfe von Lichtweginvarianten.
Pflüg. Arch. 319, R60, 1970
- 112) WODICK, R. und D. W. LÜBBERS : Quantitative Analyse von Reflexionsspektren mit inhomogenen Lichtwegen an Mehrkomponentensystemen mit Hilfe der Queranalyse I, II
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd. 354, 903-922, 1973
- 113) WODICK, R. und D. W. LÜBBERS : Ein neues Verfahren zur Bestimmung des Oxygenierungsgrades von Hämoglobinspektren bei inhomogenen Lichtwegen, erläutert an der Analyse von Spektren der menschlichen Haut.
Pflüg. Arch. 342, 41-60, 1973
- 114) WODICK, R. und D. W. LÜBBERS : Quantitative evaluation of reflexion spectra of living tissue
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd. 355, 583-594, 1974
- 115) WODICK, R. und D. W. LÜBBERS : Methoden zur Bestimmung des Lichtweges bei der Photometrie trüber Lösungen oder Gewebe mit durchfallendem oder reflektiertem Licht
Pflüg. Arch. 342, 29-40, 1973
- 116) WODICK, R., LÜBBERS, D. W. und E. PIONTEK : Mehrkomponentenanalyse von Summenspektren unter Verwendung des gesamten gemessenen Spektralbereichs
Pflüg. Arch. 297, 94, 1967
- 117) WOLTER, H. : Farboperatoren und ihre Darstellung durch Matrizen und Integralkerne
Ann. Physik 7, 16, 184, 1965

- 118) WOLTER, H. : Physikalische Begründung eines Farbenkreises und Ansätze zu einer physikalischen Farbenlehre
Ann.Physik.6,8,12,1950
- 119) WOLTER, H. : Handbuch der Physik
Herausgeb.S.Flügge,24,567 und 630
1955
- 120) WOLTER, H. : Zur Messung physikalischer Größen mit Hilfe der Farben
Ann.Physik 6,17,329,1956
- 121) YOUNG, A.T. : Temperature effects in photo-multipliers and astronomical photometry
Appl.Opt.2,51-60,1963
- 122) YOUNG, A.T. : Undesirable effects of cooling photomultipliers
Rev.Sci.Instr.38,1336,1967
- 123) YOUNG, A.T. : Appl.Opt.8,2431,1969

Herrn Prof.Dr.D.W.Lübbers,dem Direktor des Max-Planck-Instituts für Systemphysiologie in Dortmund,danke ich recht herzlich für sein unermüdliches Interesse an dieser Arbeit und für die großzügige Bereitstellung der benötigten Geräte.

In vielen Diskussionen konnte ich zahlreiche Anregungen und Ratschläge empfangen,die sich in einer besonders zielgerichteten Abwicklung der Untersuchungen auswirkten,da Herr Prof.Lübbers selbst seit Jahren auf dem Gebiet der Fotometrie erfolgreich tätig ist.Meine biomedizinischen Kenntnisse wurden dank der lehrreichen Unterredungen zu einem geschlosseneren Bild ergänzt, zu dem auch die regelmäßig stattfindenden Seminare und Vorträge im Institut beitrugen.

Herrn Prof.Dr.H.Wolter,dem Leiter des Instituts für Angewandte Physik der Philipps-Universität Marburg,bin ich sehr verpflichtet, da er das Patronat meiner Promotion übernahm und dankenswerterweise in dem mir bis dahin unbekannten Marburger-Universitätsbereich viele fördernde Ratschläge erteilte.

Die mathematisch-physikalische Beschreibung der Fluoreszenz-fotometrie mit Indikatoren konnte besonders gut mit Hilfe der Wolter'schen Farbenlehre erfolgen.

Herrn Prof.Dr.M.Boldt,Dozent an der Fachhochschule in Dortmund, danke ich für die freundlich-kollegiale Einführung in das Gebiet der Fluoreszenzfotometrie.

L E B E N S L A U F

Am 6.Mai 1947 wurde ich als Sohn des Richtmeisters Heinrich Opitz und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Nettmann, in Kirchende/Herdecke geboren.

Nach der Volksschule besuchte ich ab Ostern 1957 das Max-Planck-Gymnasium in Dortmund und wählte den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig der Schule. Im Sommer 1967 absolvierte ich dort die Reifeprüfung.

Zum Wintersemester 1967/68 immatrikulierte ich an der RWTH-Aachen im Fach Physik. Nach dem Vordiplom fertigte ich im Institut für Physikalische Chemie, Abteilung Biopolymere, unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Schönert meine Diplomarbeit an und legte im Wintersemester 1972/73 die Diplomhauptprüfungen für Physiker ab.

Seit dem 1. Mai 1973 bin ich wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Herrn Prof. Dr. D. W. Lübbers, dem Direktor des Max-Planck-Instituts für Systemphysiologie in Dortmund. Da mir freigestellt wurde, die wissenschaftlichen Resultate meiner Tätigkeit in einer Dissertation zu verwenden, immatrikulierte ich zum Sommersemester 1975 an der Philipps-Universität in Marburg/Lahn, wo Herr Prof. Dr. H. Wolter, Leiter des Instituts für Angewandte Physik, das Patronat meiner Promotion übernahm.

Am 29. Dezember 1973 heiratete ich meine Frau Nina, geb. Bulgaru, in Buckarest (Rumänien).

